

Synthesis, Cytotoxic Activity and Docking Study of Two Indole-Chalcone Derivatives

Hassan Mirzaei¹,
Mohammad Shokrzadeh²,
Saeed Emami³

¹ PhD Student, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 1, 2017 Accepted September 20, 2017)

Abstract

Background and purpose: Chalcones are promising lead for anticancer drug design and discovery. Chalcones with different mechanisms including tubulin polymerization inhibition induce apoptosis in cancer cells. The aim of current work was synthesis of two indole-chalcone derivatives and investigation of their cytotoxic activity against cancer and normal cell lines, as well as molecular docking study with the proposed target tubulin.

Materials and methods: In this study, the indole-chalcone derivatives (**3a** and **3b**) were prepared by the reaction of 4-methoxybenzaldehyde with 3-acetylindole or *N*-methyl-3-acetyl-indole in the presence of LiOH as catalyst. The pure compounds obtained were characterized by ¹H NMR, IR, and Mass spectroscopy. The cytotoxic activity of synthesized compounds was tested using MTT assay toward four cancer cell lines (A549, MCF7, HepG2 and SKOV3) and a normal cell line (NIH3T3) in comparison with etoposide. Molecular docking was performed by using AutoDock 4.2 software to evaluate potential mechanism and interactions of chalcone compounds with the tubulin (1SA0) binding site.

Results: The ¹H NMR spectra of compounds showed two doublets related to the vinylic protons with coupling constant value of 15.6 Hz, demonstrating *trans* configuration of the compounds. Cytotoxicity assay showed that these compounds had a significant effect against viability of cancer cells. The compound **3b** with IC₅₀ value of 8.1 µg/ml against HepG2 had the most potent cytotoxic effect. Furthermore, this compound had no significant cytotoxic effect against normal cell line. Docking analysis showed that compound **3b** is bound to the colchicine binding site of tubulin via hydrogen and hydrophobic interactions.

Conclusion: The indole-derived chalcones had a significant selective cytotoxic effect against cancer cells. The *N*-methyl-indole analog **3b** showed better profile of activity against tested cell lines. This analog can be considered as a lead compound for further optimization and development of potent anticancer agents.

Keywords: chalcone, anticancer agents, MTT assay, tubulin polymerization, docking

سنتر، بررسی اثرات سیتوتوکسیک و مطالعه داکینگ دو مشتق ایندول-چالکون

حسن میرزایی^۱محمد شکرزاده^۲سعید امامی^۳

چکیده

سابقه و هدف: چالکون‌ها الگویی برای طراحی و کشف داروهای ضدسرطان هستند و با مکانیسم‌های مختلف از جمله مهار پلیمریزاسیون توبولین باعث القای آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردند. مطالعه حاضر در راستای سنتر دو ترکیب چالکونی، ارزیابی سمیت سلولی آن‌ها روی سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال و همچنین مطالعه داکینگ ملکولی این ترکیبات به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از واکنش ۴-متوکسی بنزالدهید با ۳-استیل ایندول یا *N*-متیل-۳-استیل ایندول در حضور لیتیم هیدروکسید به عنوان کاتالیست ترکیبات چالکونی تهیه شدند و ساختار آن‌ها با استفاده از طیف‌های NMR، IR و Mass مورد تایید قرار گرفت. سمیت سلولی این ترکیبات با روش MTT بر روی رده‌های سلول سرطانی HepG2، MCF7، A549 و SKOV3 و همچنین روی رده سلولی نرمال NIH3T3 و در مقایسه با اتوپوزید بررسی شد. سپس برای بررسی مکانیسم احتمالی این ترکیبات، با بهره‌گیری از روش داکینگ ملکولی و با استفاده از نرم افزار AutoDock 4.2 برهمکنش‌های این ترکیبات با جایگاه اتصال کلشی‌سین در پروتئین توبولین (ISA0) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: بر اساس طیف سنجی ¹H NMR و با توجه به ثابت کوپلاژ هیدروژن‌های وینیلی ($J = 15.6 \text{ Hz}$)، چالکون‌های سنتر شده از کانفیگوراسیون ترانس برخوردار هستند. نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی نشان داد که این ترکیبات اثر قابل توجهی در مهار سلول‌های سرطانی دارند. ترکیب **3b** با IC₅₀ برابر با ۸/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیش‌ترین فعالیت را روی رده سلولی HepG2 داشت. ضمن این‌که ترکیب فوق‌الذکر فاقد اثر سمی قابل توجه روی رده سلولی نرمال NIH3T3 بود. هم‌چنین آنالیز داکینگ نشان داد که ترکیب **3b** با برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبیک با ریشه‌های اسید آمینه موجود در جایگاه اتصال کلشی‌سین در پروتئین توبولین (ISA0) ارتباط برقرار می‌کند.

استنتاج: ترکیبات ایندول-چالکونی سنتر شده می‌توانند به صورت اختصاصی رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند. آنالوگ *N*-متیل ایندول (ترکیب **3b**) پروفایل اثر بهتری را روی سلول‌های سرطانی مورد آزمایش نشان داد. این ترکیب می‌تواند به عنوان الگویی ساختاری برای بهینه‌سازی و توسعه ترکیبات قوی ضدسرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: چالکون، ترکیبات ضدسرطان، تست MTT، پلیمریزاسیون توبولین، داکینگ

مقدمه

تکثیر و تمایز سلول‌ها دچار اختلال می‌شوند. در صورت ایجاد موتاسیون ژنتیکی مخرب، سلول‌های نرمال از مسیر رشد طبیعی خود خارج شده و به سمت ایجاد

سرطان به مجموعه گوناگونی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که در اثر افزایش مهار نشده‌ی تکثیر سلول‌ها به وجود می‌آید. در این بیماری مکانیسم‌های حاکم بر

Email: sd_emami@yahoo.com

مؤلف مسئول: سعید امامی - مازندران، ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی

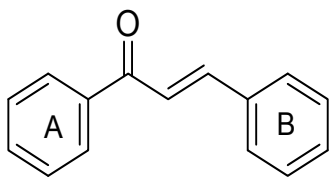
۱. دانشجوی دکتری پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۶/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۶/۲۹

هستند و می‌توانند منجر به آلکیله شدن نوکلئوفیل‌ها شوند، بنابراین نقش پذیرنده مایکل (Michael acceptor) را دارند (۸، ۹).



تصویر شماره ۱: ساختار کلی چالکون

ترکیبات چالکونی اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله ضدلشمانیا، ضدقارچ، ضدویروس، ضد مالاریا، ضد التهاب و... از خود نشان می‌دهند (۱۰). یکی از مهم‌ترین اثرات چالکون‌ها، خاصیت ضدسرطانی می‌باشد که با مکانیسم‌های متعددی از جمله القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی صورت می‌گیرد (۱۱). مشتقات متعددی از چالکون‌ها با فعالیت ضد سرطانی گزارش شده است (۷). یکی از استراتژی‌هایی که برای طراحی چالکون‌های جدید مورد توجه قرار گرفته است، جایگزینی یکی از حلقه‌های فیل با هتروسیکل‌های مختلف از جمله ایندول است (۱۲). براین اساس در این تحقیق، دو مشتق چالکون-ایندول سنتز گردیده و اثرات سیتوتوکسیک آن‌ها روی سلول‌های سرطانی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. ضمناً با توجه به این که یکی از مکانیسم‌های شناخته شده چالکون‌ها، مهار پلیمریزاسیون توبولین است، لذا داکینگ مولکولی ترکیبات مذکور در جایگاه اتصال کلشی سین در پروتئین توبولین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

سنتز ترکیبات

نمای کلی سنتز ترکیبات مورد نظر در تصویر شماره ۲ آورده شده است. تمامی واکنش‌ها و ترکیبات به دست آمده به وسیله کروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC) کنترل شدند. روش TLC با استفاده از ورقه‌های

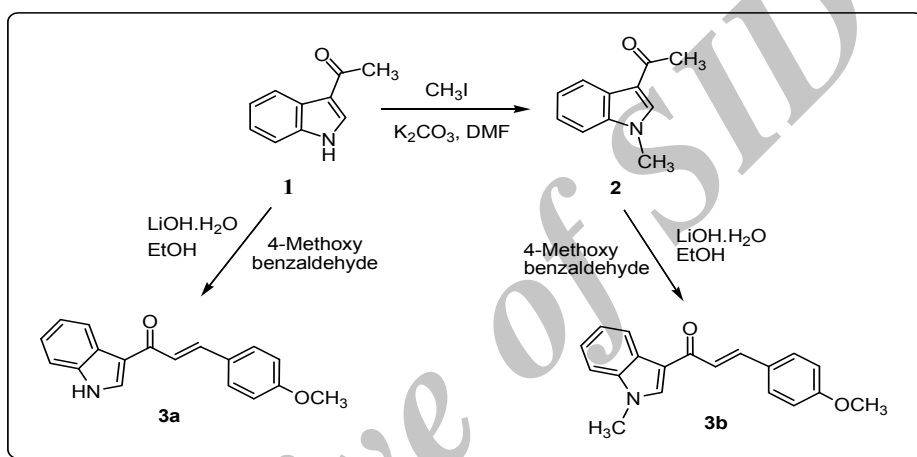
سلول‌های توموری می‌روند (۱، ۲). مطابق گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، این بیماری دومین عامل مهم مرگ و میر در جهان محسوب می‌گردد. بنابر پیش‌بینی‌ها، در کشور ایران نیز بروز سرطان در سال ۱۳۹۹ هجری شمسی در حدود ۸۶۰۰۰ بیمار و میزان مرگ و میر ناشی از آن به ۶۳۰۰۰ مورد خواهد رسید (۴، ۳).

امروزه شیمی درمانی یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای درمان سرطان می‌باشد، اما سمیت بالای داروهای شیمی درمانی موجب عوارض جانبی متعدد می‌شود که این عوارض عبارتند از سرکوب سیستم ایمنی، آسیب بافت‌های کبد و کلیه، کم‌خونی، ریزش مو و... (۵). ایجاد سلول‌های توموری مقاوم به داروهای ضد سرطان و تخریب بافت‌های سالم از عمده‌ترین مشکلات برای بیماران سرطانی در طول زمان شیمی درمانی می‌باشد. بدین جهت با توجه به مشکلات فوق، پژوهشگران تلاش‌های فراوانی را برای کشف ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی با خواص ضدسرطانی به کار گرفته‌اند. یکی از استراتژی‌های مهم در علم شیمی دارویی، بهبود کارایی و کاهش سیتوتوکسیسیته داروهای ضدسرطان می‌باشد (۶، ۵). بدین منظور ترکیبات ضدسرطان با کارایی بالا باید بتوانند با مکانیسم‌های مختلف باعث توقف رشد سلول‌های سرطانی و آپوپتوز در آن‌ها شوند، اما در حیات سلول‌های نرمال تاثیری نداشته باشند.

چالکون با نام شیمیایی ۱،۳-دی آریل-۲-پروپن-۱-اون (تصویر شماره ۱) در برگیرنده دو حلقه آروماتیک با یک زنجیره سه‌کربنه شامل یک پیوند دوگانه و گروه کربونیل است. در سالیان اخیر، چالکون‌ها و مشتقات آن‌ها با افزایش کاربردهای متعدد دارویی توجه را به خود جلب کرده‌اند. چالکون‌ها در ساختار بسیاری از ترکیبات بیولوژیک مهم نقش داشته و پیش‌ساز فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها به شمار می‌روند و در بسیاری از گیاهان وجود دارند (۷). از لحاظ شیمیایی، چالکون‌ها دارای ساختار کربونیل α و β -نااشباعی

Elmer و طیف رزونانس مغناطیسی هیدروژن (^1H NMR) با بهره‌گیری از دستگاه اسپکترومتر Bruker 400 MHz تهیه گردید و جا به جایی شیمیایی (δ) بر حسب ppm و در مقایسه با شاهد داخلی تترامیل سیلان (TMS) بود. طیف جرمی ترکیبات با دستگاه HP 5937 Mass Selective Detector (Agilent technologies) ثبت گردید.

نازک آلومینیومی دارای لایه نازک سیلیکاژل صورت پذیرفت و پس از قرار گرفتن در حلال مناسب و پیشرفت حلال و جدا شدن لکه‌ها روی سیلیکاژل، لکه‌ها به وسیله لامپ ماوراء بنفش (UV) قابل رؤیت گردید. تغلیظ محلول‌ها پس از انجام واکنش و استخراج به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء صورت گرفت. نقطه ذوب مواد به وسیله دستگاه Bibby Stuart Scientific SMP3 و طیف مادون قرمز (IR) با استفاده از دستگاه Perkin



تصویر شماره ۲: سنتز مشتقات چالکون

تهیه ترکیب **3a**: ابتدا ۳-استیل ایندول (ترکیب **1**، ۱ میلی مول) در اتانول مطلق (۲ میلی لیتر) حل شد و سپس هیدروکسید لیتیم پودر شده (۰/۱ میلی مول) به محلول واکنش اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه بهم زده شد. در مرحله بعدی ۴-متوکسی بنزالدهید به محلول اضافه گردید. واکنش با استفاده از TLC پیگیری شد. پس از ۲۴ ساعت، واکنش پایان یافت. در پایان واکنش، رسوب زرد رنگ در مخلوط واکنش قابل رویت بود. به مخلوط واکنش آب اضافه کرده و پس از یک شب ماندن در یخچال، رسوب حاصل صاف و با اتانول سرد (۳ بار، هر بار ۳ میلی لیتر) شسته شد. برای به دست آوردن محصول خالص،

تهیه *N*-متیل-۳-استیل ایندول (۲): ابتدا ۳-استیل ایندول (ترکیب **1**، ۱ میلی مول) را در ۶ میلی لیتر از DMF حل کرده و سپس کربنات پتاسیم (۰/۵ میلی مول) پودر شده را به محلول واکنش اضافه و اجازه می‌دهیم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شود. در مرحله بعدی متیل یداید به صورت تدریجی به محلول واکنش اضافه شد و سپس رفلاکس گردید. واکنش تا مصرف مواد اولیه ادامه یافت و روند پیشرفت واکنش با استفاده از TLC پیگیری شد. پس از ۶ ساعت واکنش پایان یافت. سپس به مخلوط واکنش آب اضافه شد و با اتر (۳ بار، هر بار ۲۵ میلی لیتر) استخراج گردید. پس از خشک کردن فاز آلی با سولفات سدیم بدون آب، حلال در فشار کم تبخیر گردید و ترکیب **2** به صورت خالص به دست آمد (۱۳).

رسوب حاصل بعد از صاف کردن، مجدداً در اتانول متبلور و در دمای اتاق خشک گردید (۱۴).

تهیه ترکیب 3b: برای تهیه ترکیب 3b مشابه روش تهیه 3a عمل شد، بجز این که بجای ۳-استیل ایندول (1) از N-متیل-۳-استیل ایندول (2) استفاده گردید.

تست سمیت سلولی

رده‌های سلولی سرطان کبد (HepG2)، سرطان سینه (MCF7)، سرطان ریه (A549)، سرطان تخمدان (SKOV3) و رده سلولی نرمال فیروبللاست موش (NIH3T3) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI / DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. پس از رشد ۷۰ درصدی، سلول‌ها توسط تریپسین - ایتیلن‌دی‌آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شدند و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد و پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد.

جهت سنجش سمیت سلولی مشتقات چالکون از روش MTT assay استفاده شد. ابتدا ترکیبات سنتز شده در حلال DMSO حل گردید و رقت‌های مورد نظر شامل ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه شد. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون‌ها ۰/۱ درصد بود تا اثر سمیت این ماده به حداقل مقدار خود برسد. در این مطالعه از کشت‌های سلولی در فاز رشد و تکثیر استفاده گردید. در مرحله بعدی، ۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ده

هزار سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوباسیون گردید. پس از طی ۲۴ ساعت انکوباسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر به چاهک‌ها اضافه شد. هر رقت مشتقات چالکون سنتز شده در سه چاهک سنجش شد. پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر، به منظور بررسی اثر سمیت سلولی مشتقات چالکون از روش رنگ‌سنجی با استفاده از نمک تترازولیوم معروف به تست MTT استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، محلول رویی خارج و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل گردد. به منظور تعیین میزان جذب نوری هر چاهک که معرف میزان سلول‌های زنده آن می‌باشد، جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریپدر (BioTeck) در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد بقای سلولی از تقسیم میانگین جذب نوری هر گروه مورد آزمایش بر میانگین جذب نوری گروه کنترل ضرب در عدد ۱۰۰ محاسبه گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.16 و آزمون ANOVA آنالیز شد و مقادیر کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مطالعه داکینگ

آماده‌سازی پروتئین: ساختار کریستالوگرافی شده توپولین (PDB ID: 1SA0) از بانک اطلاعات پروتئین استخراج گردید. تمامی مولکول‌های آب، یون منیزیم، GDP، GTP و سایر ملکول‌ها از پروتئین مورد نظر حذف شدند. زنجیره‌های A و B به عنوان رسپتور هدف انتخاب شد. لوپ‌ها و ریشه‌های اسید آمینه از دست رفته در فایل کریستالوگرافی توسط برنامه Modeller

یافته ها

یافته‌های شیمیایی مربوط به ترکیبات سنتز شده خالص سازی ترکیبات با روش‌های متداول استخراج و تبلور مجدد انجام شد و ساختار آن‌ها با روش‌های طیف سنجی مورد تایید قرار گرفت. اسامی شیمیایی، بازده واکنش، نقطه ذوب و اطلاعات طیفی شامل IR، NMR و MS ترکیبات سنتز شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. طیف‌سنجی $^1\text{H NMR}$ چالکون‌های سنتز شده نشان می‌دهد که با توجه به ثابت کوپلاژ هیدروژن‌های وینیلی ($J= 15.6 \text{ Hz}$)، ترکیبات مذکور از کانفیگوراسیون ترانس برخوردار هستند.

فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات

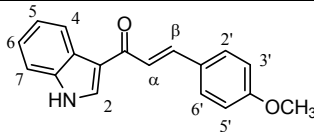
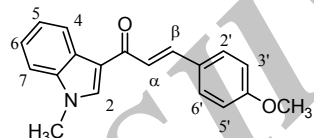
اثرات سمیت سلولی غلظت‌های مختلف مشتقات سنتز شده با کمک روش MTT بر روی رده‌های سلولی سرطان کبد (HepG2)، سرطان سینه (MCF7)، سرطان ریه (A549)، سرطان تخمدان (SKOV3) و رده سلولی نرمال فیروبلاست موش (NIH3T3) در مقایسه با اتوپوزاید به‌عنوان داروی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. اثرات ترکیب **3a** و **3b** در غلظت‌های مختلف (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نمودارهای شماره ۱ و ۲ به نمایش درآمده است. هم‌چنان که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت ترکیب از ۱ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت، توانایی زنده بودن سلول‌ها نسبت به حالت کنترل کاهش می‌یابد.

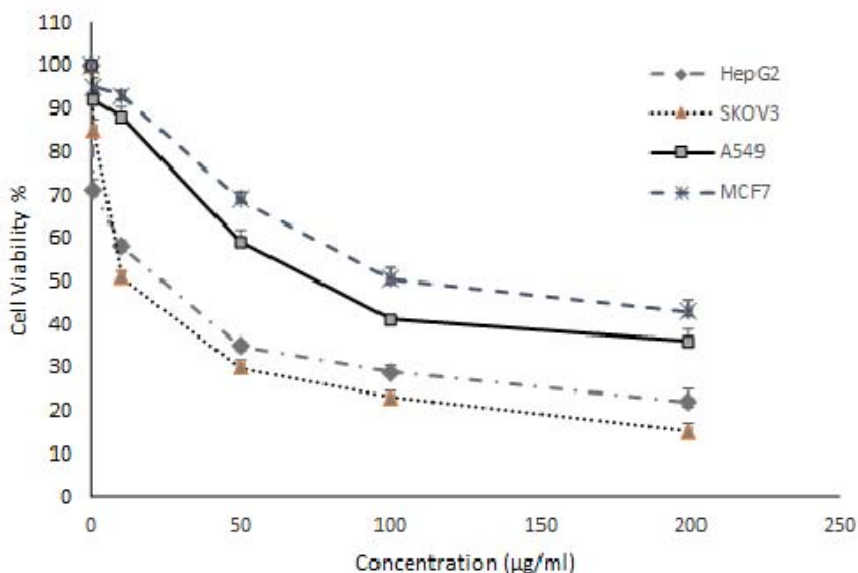
9.17 بازسازی شدند (۱۵) و به عنوان ورودی نرم افزار AutoDock استفاده شد. سپس اتم‌های هیدروژن به ساختار پروتئین افزوده شد، بار الکتریکی آن با استفاده از Kollman charge تعیین گردید. سپس هیدروژن‌های غیر یونیزه ادغام شد.

آماده‌سازی لیگاند: ابتدا ساختار دوبعدی لیگاندها توسط برنامه ChemDraw Ultra 8.0 ترسیم شد و سپس با استفاده از نرم افزار HyperChem از نظر انرژی بهینه شد. بار الکتریکی Gastiger و تعداد درجات آزادی زوایای پیچشی لیگاند نیز محاسبه و ذخیره شد. در نهایت لیگاندهای بهینه شده به‌عنوان ورودی نرم افزار AutoDock Tools 4.2 استفاده شد.

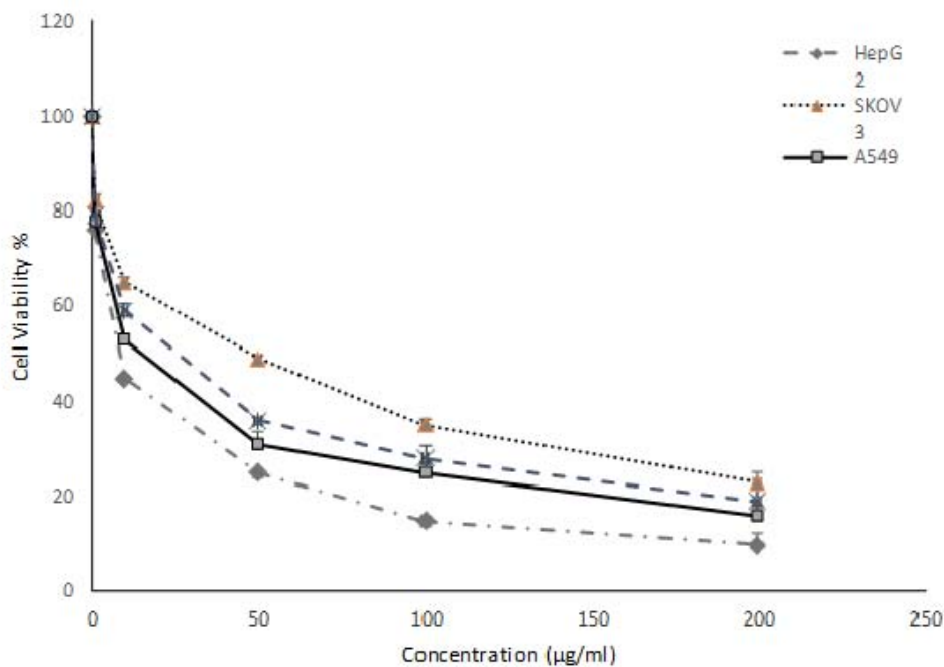
داکینگ مولکولی: پس از تهیه فایل‌های مورد نیاز داکینگ به منظور بررسی برهمکنش مولکولی بین ترکیبات چالکون و رسپتور هدف از نرم‌افزار اختصاصی داکینگ مولکولی AutoDock 4.2 استفاده شد. برای انجام محاسبات داکینگ از اندازه باکس $40 \times 40 \times 40$ استفاده شد و فاصله بین نقاط شبکه (Point spacing) برای هر لیگاند، عدد 0.375 انتخاب شد. سپس مختصات مرکز ثقل لیگاند کریستالوگرافی موجود در جایگاه اتصال کلشی سین به عنوان مرکز گرید باکس تعیین شد. از الگوریتم ژنتیک لامارکین برای جستجوی محلی تکرار شونده استفاده گردید. پس از انجام محاسبات داکینگ، بهترین کانفورماسیون با پایین‌ترین میزان انرژی آزاد اتصال، انتخاب و در نهایت برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی کمپلکس توپولین-لیگاند به وسیله نرم افزار DS Visualizer V 16.1 آنالیز گردید (۱۶).

جدول شماره ۱: اسامی شیمیایی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و طیفی ترکیبات سنتز شده

اطلاعات فیزیکوشیمیایی و طیف سنجی	ساختمان و نام شیمیایی	کد ترکیب
<p>Yield: 57%; mp: 205-207 °C</p> <p>IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3448 (NH), 1638 (C=O).</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.81 (s, 3H, OCH₃), 7.01 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 7.18-7.26 (m, 2H, H_{5,6}), 7.49 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.8 and 1.6 Hz, H₇), 7.59 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, H_{α}), 7.70 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, H_{β}), 7.80 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz, H_{2,6'}), 8.33 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.8 and 1.6 Hz, H₄), 8.69 (s, 1H, H₂), 12.1 (s, 1H, NH).</p> <p>MS (m/z, %): 277 (M⁺, 100), 262 (27), 248 (13), 217 (8), 204 (17), 169 (21), 144 (52), 116 (28), 102 (11), 89 (37), 77 (10), 63 (14).</p>	<p>(<i>E</i>)-1-(1<i>H</i>-indol-3-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one</p> 	3a
<p>Yield: 51%; mp: 129-131 °C</p> <p>IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3445 (NH), 1640 (C=O).</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, NCH₃), 7.02 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 7.24-7.33 (m, 2H, H_{5,6}), 7.57 (d, 1H, <i>J</i> = 6.8 Hz, H₇), 7.59 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, H_{α}), 7.64 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, H_{β}), 7.79 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz, H_{2,6'}), 8.34 (dd, 1H, <i>J</i> = 7.2 and 0.8 Hz, H₄), 8.70 (s, 1H, H₂).</p> <p>MS (m/z, %): 291 (M⁺, 100), 276 (17), 263 (28), 158 (60), 131 (27), 103 (20), 89 (16), 77 (24).</p>	<p>(<i>E</i>)-3-(4-methoxyphenyl)-1-(1-methyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)prop-2-en-1-one</p> 	3b



نمودار شماره ۱: تاثیر ترکیب 3a بر رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های مختلف (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مدت زمان ۴۸ ساعت. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۲: تاثیر ترکیب **3b** بر رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های مختلف (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مدت زمان ۴۸ ساعت. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد ($p < 0.05$)

ترکیب **3a** روی این سلول‌ها دارد. در حالی که اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت دارای IC_{50} معادل ۷/۸ تا ۹/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و قوی‌تر از ترکیبات چالکونی روی رده‌های سلولی سرطانی A549 و MCF7 عمل می‌کند.

سمیت سلولی مشتقات چالکون روی رده سلول سرطانی SKOV3 نشان داد که ترکیب **3a** با IC_{50} معادل ۱۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت بیش‌تری نسبت به ترکیب **3b** با IC_{50} معادل ۴۹/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارد. در حالی که اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت دارای IC_{50} معادل ۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

مقادیر IC_{50} به‌دست آمده برای مشتقات چالکون روی رده سلول نرمال NIH3T3 حاکی از آن است که این ترکیبات اثر سمی بسیار ضعیفی روی سلول‌های نرمال دارند ($IC_{50} \geq 112.0 \mu\text{g/ml}$) بنابراین با توجه به مقادیر کم‌تر IC_{50} به‌دست آمده برای دو ترکیب

مقادیر محاسبه شده IC_{50} هر یک از ترکیبات چالکونی به همراه اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نرمال، در جدول شماره ۲ آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، مقادیر IC_{50} دو ترکیب چالکونی روی سلول‌های سرطانی در محدوده ۸/۱ تا ۱۰۵/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج نشان می‌دهد که ترکیب **3b** بیش‌ترین سمیت ($IC_{50} = 8.1 \mu\text{g/ml}$) و ترکیب **3a** دارای کمترین اثر سمی ($IC_{50} = 24.2 \mu\text{g/ml}$) در رده سرطانی HepG2 می‌باشند. در حالی که اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت دارای IC_{50} معادل ۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین ترکیب **3b** در مقایسه با اتوپوزاید فعالیت بیش‌تری روی رده سرطانی HepG2 دارد. علاوه بر این نتایج حاصل از اثر سمیت سلولی مشتقات چالکون بر رده‌های سلولی سرطانی A549 و MCF7 نشان داد که ترکیب **3b** به ترتیب با مقادیر IC_{50} معادل ۱۶ و ۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت سلولی بیش‌تری نسبت به

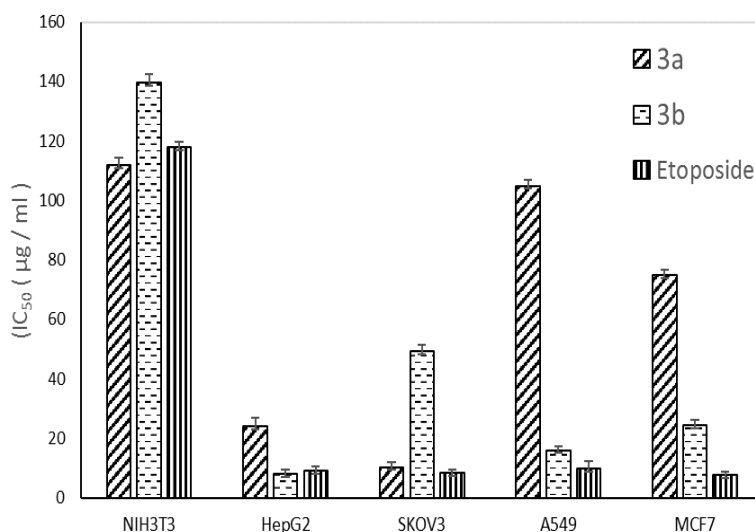
با توجه به نتایج حاصل از نمودار شماره ۱ و ۲ و همچنین مقادیر IC_{50} می توان نتیجه گرفت که ترکیب **3b** پروفایل اثر بهتری را نسبت به ترکیب **3a** نشان داده است، لذا ترکیب **3b** برای مطالعه داکینگ ملکولی مورد استفاده قرار گرفت. نمودار شماره ۳ مقادیر IC_{50} را برحسب هر رده سلولی نشان می دهد.

چالکونی روی سلول های سرطانی می توان نتیجه گرفت که این ترکیبات به صورت اختصاصی روی سلول های سرطانی عمل می کنند. ترکیب **3a** روی SKOV3 و ترکیب **3b** روی HepG2 بیش ترین اختصاصیت (Selectivity index) را نشان می دهند.

جدول شماره ۲: مقادیر IC_{50} (میانگین \pm انحراف استاندارد) ترکیبات روی رده های سلول سرطانی و نرمال بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

($\mu\text{g/ml}$)

Compound	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	A549	MCF7	SKOV3	HepG2	NIH3T3
3a	$105/4 \pm 0/7$	$75/0 \pm 0/8$	$10/4 \pm 0/7$	$24/2 \pm 0/1$	$112/0 \pm 1/2$
3b	$16/0 \pm 0/8$	$24/4 \pm 0/9$	$49/3 \pm 0/3$	$8/1 \pm 0/1$	$139/7 \pm 1/4$
Etoposide	$7/8 \pm 0/1$	$9/9 \pm 0/4$	$8/5 \pm 0/4$	$9/0 \pm 0/1$	$118/0 \pm 0/1$



نمودار شماره ۳: مقادیر IC_{50} محاسبه شده ترکیبات **3a**، **3b** و داروی اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت در رده های سلول سرطانی و نرمال بر

حسب میکروگرم بر میلی لیتر

آنگسترم بود که نشان می دهد پارامترهای لحاظ شده در فرایند داکینگ از دقت مناسبی برخوردار است. ارزیابی نتایج داکینگ ترکیبات سنتز شده با رسپتور توسط برنامه DS Visualizer 16.1 نشان داد که ریشه اسید آمینه Tyr224 با گروه کربونیل ترکیب **3b** پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد (تصویر شماره ۳) و اسیدهای آمینه Asp98, Gly144, Ala99, Thr145

داکینگ

جهت معتبرسازی نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات چالکون سنتز شده، از لیگاند موجود در ساختار کریستالوگرافی پروتئین ISA0 استفاده گردید. برای این منظور لیگاند کریستالوگرافی مجدداً به درون جایگاه خود داک گردید و RMSD آن اندازه گیری شد. مقدار RMSD لیگاند داک شده و کریستاله، ۰/۹۹

بعد از قرار گرفتن در معرض ترکیبات سنتز شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

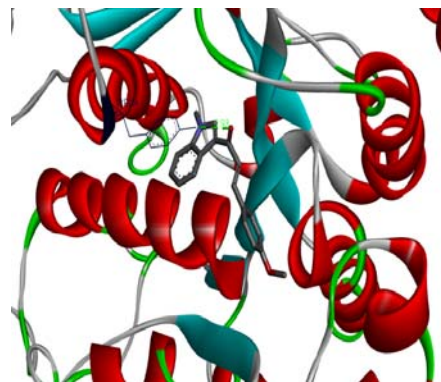
نتایج آزمایشات سیتوتوکسیک نشان می‌دهد که بقا سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت ترکیب مورد استفاده می‌باشد. به طوری که غلظت‌های بالاتر دارای اثرات سیتوتوکسیک بیش‌تری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این ترکیب می‌باشد. براساس نتایج به دست آمده از سنجش سمیت سلولی، ترکیب **3b** در سه رده سلولی HepG2، MCF7 و A549 سمیت سلولی بیش‌تری در مقایسه با ترکیب **3a** داشت. در حالی که ترکیب **3a** تنها در رده سلولی سرطانی SKOV3 دارای سمیت سلولی بیش‌تر در مقایسه با ترکیب **3b** بود (جدول شماره ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حضور گروه متیل در اتم ازت ریشه ایندول، تأثیر به‌سزایی در میزان اثر سیتوتوکسیک داشته است.

هم‌چنین سمیت سلولی ترکیبات با داروی استاندارد اتوپوزاید مقایسه و نتایج به دست آمده نشان داد که در رده سلولی HepG2، ترکیب **3b** سمیت سلولی بیش‌تری نسبت به داروی مذکور داشته است.

همان‌گونه که قبلاً هم اشاره گردید، یکی از استراتژی‌های مهم برای توسعه چالکون‌های ضدسرطان، جایگزینی حلقه‌های فنیل چالکون با هتروسیکل‌های مختلف است (۱۲). ما در مطالعات گذشته از این استراتژی با به کارگیری حلقه‌های کرومن و کومارین در ترکیبات چالکونوئید ضدسرطان بهره‌برده‌ایم (۱۸، ۱۷، ۹). حلقه ایندول هم یکی از مهم‌ترین هتروسیکل‌ها در طبیعت می‌باشد و در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیک یافت می‌گردد. حلقه ایندول در ساختار بسیاری از عوامل دارویی جدید از جمله داروهای ضدسرطان نیز یافت می‌شود (۱۹).

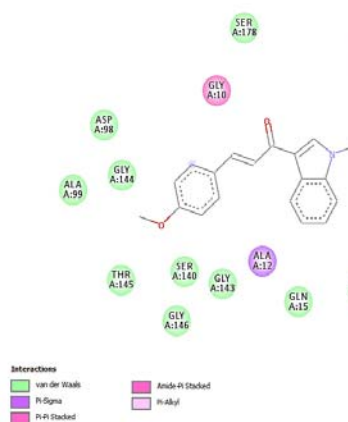
Kumar و همکارانش در سال ۲۰۱۰، فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات چالکون- ایندولی 4 (تصویر شماره ۵) را روی سه رده سلولی سرطانی شامل اپی‌تلیال (A-549)، کارسینوما پانکراتیک (Paca-2) و

Asn228، Gln15، Gly143، Gly146، Ser140 و Ser178 در جایگاه فعال آنزیم با ترکیب **3b** پیوند اندروالس می‌دهد. هم‌چنین این ترکیب با اسیدهای آمینه Ile11، Gly10، Ile171، Ala12 و برهمکنش هیدروفوبیک می‌دهد (شکل شماره ۴).



تصویر شماره ۳: نحوه قرارگیری ترکیب **3b** در جایگاه فعال

آنزیم 1SA0 به صورت مدل سه بعدی



تصویر شماره ۴: نمایش دو بعدی برهمکنش‌های هیدروفوبی و

اندروالس ترکیب **3b** با جایگاه فعال پروتئین 1SA0

بحث

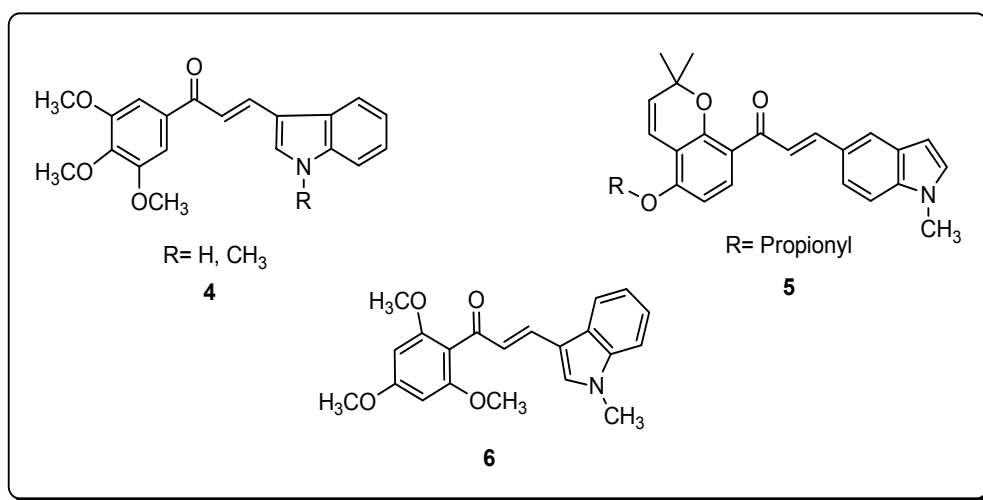
در این مطالعه دو ترکیب ایندول-چالکونی سنتز شدند و اثر ضد سرطانی آن‌ها روی رده‌های سلولی سرطانی با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در این روش میزان حیات سلول و سمیت سلولی

ملکولی داکینگ ثابت کرد که این ترکیب با جایگاه اتصال توبولین در کلشی سین واکنش می‌دهد (۲۱). لذا می‌توان استنباط کرد که گروه *N*-متیل ایندول نقش به سزائی در سمیت سلولی و مهار جایگاه اتصال کلشی سین در پروتئین توبولین دارد و با نتایج مطالعه حاضر سازگار می‌باشد.

Boumendjel و همکارانش نیز یک سری از مشتقات چالکون- ایندولی 6 (تصویر شماره ۵) را طراحی و سنتز نموده و اثرات مهارى آنها را روی ۴ رده سلولی انسانی و موشی glioblastoma با استفاده از فلوسایتمتری روی گلیکوپروتئین p (P-gp) و Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) ارزیابی کردند و مشاهده نمودند که مشتق حاوی گروه *N*-متیل در ریشه ایندول، تکثیر را مهار و سلول را در فاز میتوز متوقف می‌کند. هم‌چنین این ترکیب در جایگاه کلشی سین در توبولین متصل و باعث مهار پلیمریزاسیون توبولین می‌گردد (۲۲). نتایج این مطالعه نیز نشان داد گروه *N*-متیل ایندول می‌تواند نقش مهمی در طراحی و سنتز ترکیبات جدید ایفا کند که با یافته‌های پژوهش ما هم‌خوانی دارد.

آدنوکارسینوماى پروسئات انسانی مستقل از اندروژن (PC-3) بررسی کرده و مشاهده کردند که مشتق حاوی گروه *N*-متیل در ریشه ایندول با IC_{50} برابر با ۰/۰۳ میکرومولار، سمیت سلولی بیش‌تری در مقابل رده سلولی سرطانی Paca-2 داشت (۲۰). در ترکیبات سنتز شده توسط ما، گروه کربونیل به حلقه ایندول متصل است که برعکس پژوهش Kumar و همکارانش می‌باشد، ولی ترکیب 3b که موثرترین ترکیب مطالعه می‌باشد، حاوی حلقه ایندول متیله می‌باشد که از این منظر با یافته‌های سیتوتوکسیک مطالعه مذکور مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای دیگر، Wang و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۴ یک سری از چالکون‌های 5 (تصویر شماره ۵) حاوی حلقه ایندول را سنتز نموده و فعالیت آنها را بررسی کردند. در میان ترکیبات سنتز شده، مشتق حاوی گروه پروپونیل در جایگاه شماره ۴ حلقه فنیل A و گروه *N*-متیل-۵- ایندولیل با IC_{50} برابر با ۰/۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، موثرترین فعالیت را در مقابل رده سلولی سرطانی HepG2 دارا بود. علاوه بر این، ترکیب مذکور باعث توقف سیکل سلولی در فاز G2/M و هم‌چنین مهار پلیمریزاسیون توبولین می‌گردد. آنالیز



تصویر شماره ۵: برخی ترکیبات چالکون- ایندول گزارش شده با خاصیت سیتوتوکسیک روی سلول‌های سرطانی

جایگاه کلشی سین باعث مهار پلیمریزاسیون توبولین‌ها می‌شوند. لذا توسعه و طراحی مشتقات چالکونی به‌عنوان ترکیبات بالقوه ضدسرطانی می‌تواند مورد توجه بیش‌تری قرار گیرد.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که در این مطالعه دو ترکیب با ساختار چالکون-ایندولی سنتز شد و ساختار آن‌ها با استفاده از طیف‌سنجی NMR، IR، Mass مورد تایید قرار گرفت. سمیت سلولی این ترکیبات با روش MTT بر روی رده‌های سلول سرطانی HepG2، MCF7، A549 و SKOV3 و هم‌چنین رده سلولی نرمال NIH3T3 بررسی گردید. بر اساس یافته‌های به دست آمده از آزمون سمیت سلولی، ترکیب **3b** در سه رده سلولی HepG2، MCF7، A549 سمیت سلولی بیش‌تری داشته است. هم‌چنین این ترکیب با IC_{50} معادل ۸/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین فعالیت را در رده سرطانی HepG2 دارا بوده که در مقایسه با اتوپوزاید به عنوان کنترل مثبت سمیت بیش‌تری را نشان داد. با توجه به سمیت ناچیز این ترکیب روی سلول‌های نرمال NIH3T3 می‌توان گفت که این ترکیب از سلکتیویته بالایی برای سلول‌های سرطانی برخوردار است. مطالعه داکینگ ملکولی توسط نرم‌افزار 4.2 AutoDock برای بررسی مکانیسم احتمالی این ترکیبات انجام گرفت و آنالیز نتایج داکینگ نشان داد که ترکیب **3b** از طریق برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبیک با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال پروتئین توبولین ارتباط برقرار می‌کند و باعث مهار آن می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله در راستای پایان‌نامه آقای حسن میرزایی دانشجوی Ph.D پژوهشی مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد که از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران برخوردار بوده است. لذا از این طریق صمیمانه از معاونت متبوعه سپاسگزاری می‌نماییم.

در مطالعه ما نتایج داکینگ نشان داد که مشتق چالکونی **3b** با انرژی آزاد اتصال ۷/۵۳- کیلوکالری بر مول، اتصال قوی‌تری را نسبت به ترکیب **3a** با جایگاه فعال آنزیم دارد و موجب مهار بهتر این آنزیم می‌گردد. وجود گروه هیدروفوبیک متیل بر روی اتم ازت حلقه ایندول می‌تواند در اتصال بهتر ترکیب **3b** و رسپتور مؤثر باشد. هم‌چنین این گروه متیل می‌تواند به‌طور کامل پاکت هیدروفوبیک جایگاه فعال آنزیم را پر کند و بهترین جهت‌گیری را به منظور ایجاد پیوند هیدروژنی و هیدروفوبیک برای مولکول فراهم آورد و بر همین اساس، این مولکول بهترین انرژی پیوندی را دارا می‌باشد.

Ducki و همکارانش در سال ۲۰۰۹ یک مطالعه آنالیز داکینگ را در خصوص شباهت ساختمانی چالکون و کمبرتاستاتین و اتصال آن به جایگاه کلشی‌سین انجام دادند و نتیجه‌گیری کردند که کمبرتاستاتین با جایگاه کلشی‌سین در توبولین بتا متصل می‌گردد و چالکون‌ها نیز در همان جهت با توبولین متصل می‌گردند. لذا چالکون‌هایی حاوی حلقه فنیل، میل ترکیبی بیش‌تری در اتصال با جایگاه کلشی‌سین در توبولین بتا در مقایسه با کمبرتاستاتین دارند. با توجه به مطالعه داکینگ انجام شده ثابت گردید که انعطاف‌پذیری حلقه فنیل یک عامل مهم در اتصال به جایگاه توبولین می‌باشد (۲۴، ۲۳). از آنجایی که ترکیبات سنتز شده در پژوهش ما حاوی گروه ۴- متوکسی فنیل می‌باشند که می‌تواند با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال برهمکنش بدهد و سبب مهار جایگاه اتصال کلشی‌سین گردد، بنابراین یافته‌های به دست آمده از آنالیز مطالعه داکینگ ترکیبات سنتز شده با نتایج مطالعه مذکور مطابقت دارد.

توبولین‌ها به‌دلیل نقشی که در میتوز و تقسیم سلولی ایفا می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان هدف مهم در طراحی داروهای ضد سرطانی مورد استفاده قرار بگیرند. ترکیباتی مانند کامبرتاستاتین و چالکون‌ها با اتصال به

References

1. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol* 2008; 18(5): 372-377.
2. William Jr, William N, Heymach JV, Kim ES, Lippman SM. Molecular targets for cancer chemoprevention. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 213-225.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): 359-386.
4. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol* 2009; 20(3): 556-563.
5. Larsen ME, Rowntree J, Young AM, Pearson S, Smith J, Gibson OJ, et al. Chemotherapy side-effect management using mobile phones. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 5152-5155
6. Ansari M, Emami S. β -Ionone and its analogs as promising anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2016; 123: 141-154.
7. Mirzaei H, Emami S. Recent advances of cytotoxic chalconoids targeting tubulin polymerization: Synthesis and biological activity. *Eur J Med Chem* 2016; 121: 610-639.
8. Nakhjiri M, Safavi M, Alipour E, Emami S, Atash AF, Jafari-Zavareh M, et al. Asymmetrical 2,6-bis(benzylidene)cyclohexanones: Synthesis, cytotoxic activity and QSAR study. *Eur J Med Chem* 2012; 50: 113-123.
9. Molaverdi F, Khoobi M, Emami S, Alipour M, Firuzi O, Foroumadi A, et al. Polyoxygenated cinnamoylcoumarins as conformationally constrained analogs of cytotoxic diarylpentanoids: synthesis and biological activity. *Eur J Med Chem* 2013; 68: 103-110.
10. Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Uriarte E, Santana L. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011 - 2014). *Expert Opin Ther Pat* 2015; 25(3): 351-366.
11. Mirzaei H, Keighobadi M, Emami S. An overview of anticancer chalcones with apoptosis inducing activity. *J Mazand Univ Med Sci* 2017; 26(146): 254-268.(persian)
12. Sharma V, Kumar V, Kumar P. Heterocyclic chalcone analogues as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(3): 422-432.
13. Zahran MAH, Ibrahim AM. Synthesis and cellular cytotoxicities of new N-substituted indole-3-carbaldehyde and their indolylchalcones. *J Chem Sci* 2009; 121(4): 455-462.
14. Bhagat S, Sharma R, Sawant DM, Sharma L, Chakraborti AK. LiOH•H₂O as a novel dual activation catalyst for highly efficient and easy synthesis of 1, 3-diaryl-2-propenones by Claisen-Schmidt condensation under

- mild conditions. *J Mol Catal A: Chem* 2006; 244(1-2): 20-24.
15. Sakhteman A, Zare B. Modelface: an application programming interface (API) for homology modeling studies using Modeller software. *Iran J Pharm Res* 2016; 15(4): 801-807.
 16. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016
 17. Aryapour H, Riazi GH, Ahmadian S, Foroumadi A, Mahdavi M, Emami S, Induction of apoptosis through tubulin inhibition in human cancer cells by new chromene-based chalcones. *Pharm Biol* 2012; 50(12): 1551-1560.
 18. Firoozpour L, Edraki N, Nakhjiri M, Emami S, Safavi M, Kabudanian ,etal. Cytotoxic activity evaluation and QSAR study of chromene-based chalcones. *Arch Pharm Res* 2012; 35(12): 2117-2125.
 19. Sharma V, Kumar P, Pathak D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. *J Heterocyclic Chem* 2010; 47(3): 491-502.
 20. Kumar D, Kumar NM, Akamatsu K, Kusaka E, Harada H, Ito T. Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20(13): 3916-3919.
 21. Wang G, Li C, He L, Lei K, Wang F, Pu Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of a series of pyrano chalcone derivatives containing indole moiety as novel anti-tubulin agents. *Bioorg Med Chem* 2014; 22(7): 2060-2079.
 22. Boumendjel A, McLeer-Florin A, Champelovier P, Allegro D, Muhammad D, Souard F, et al. A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agent and an inhibitor of P-gp and BCRP in in-vitro and in-vivo glioblastoma models. *BMC Cancer* 2009; 9: 242.
 23. Ducki S. Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. *Anti-Cancer Agents in Med Chem* 2009; 9(3): 336-347.
 24. Ducki S, Rennison D, Woo M, Kendall A, Chabert JF, McGown AT, et al. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivasculature activity. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(22): 7698-7710.