کد:O23

القاء آسیب DNA در رده‌ای از سلول‌های سرطان مثانه توسط 7-isopentenyloxycoumarin در شرایط *in vitro*

فرشته حقیقی[۱]، مریم مقدم متین [۲،۱]، احمدرضا بهرامی [۲،۱]، مهرداد ایرانشاهی [۳].

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- گروه پژوهشی سلولی و ملکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

مقدمه: کومارین‌ها گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی هستند که به طور عمده در خانواده‌های Rutaceae و Apiaceae یافت می‌شوند. در دهه گذشته مشخص شد که prenyloxycoumarins، به عنوان متابولیت‌های ثانویه، دارای فعالیت‌های زیستی با ارزشی هستند. در این میان نشان داده شده که 7-isopentenyloxycoumarin که دسته‌ای از این گروه می‌باشد، دارای اثرات امید بخش ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد قارچی و ضد باکتریایی است. این ترکیب هم به صورت طبیعی از گیاهان استخراج شده و هم به صورت شیمیایی سنتز می‌شود و این نکته، اهمیت بررسی ویژگی‌های مختلف آن را افزایش داده است. هدف این پژوهش بررسی القاء آسیب DNA توسط 7-isopentenyloxycoumarin بر روی سلول‌های TCC می‌باشد.

روش‌ها: 7-isopentenyloxycoumarin از بر هم کنش ۷-هیدروکسی کومارین و ایزوپنتنیل برماید در استون و در دمای اتاق ایجاد و با کروماتوگرافی ستونی جدا گردید. سلول‌های TCC به عنوان سلول‌های سرطانی، و سلول‌های HDF به عنوان سلول‌های نرمال کشت داده شده و توسط غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ µg/ml این ترکیب تیمار شدند. از محلول‌های معادل دی متیل سولفوکساید (DMSO) نیز به عنوان کنترل استفاده شد. درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، با تکنینک MTT محاسبه گردید.

به منظور بررسی آسیب DNA در سلول‌های TCC، توسط 7-isopentenyloxycoumarin، روش comet assay به کار گرفته شد. سلول‌های تیمار نشده و سلول‌های تیمار شده با DMSO به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. هر سلول توسط نرم افزار "TriTek Cometscore version 1.5" آنالیز و آسیب DNA در قالب DNA tail گزارش شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از MTT assay نشان داد که غلظت ۶۵ µg/ml ماده 7-isopentenyloxycoumarin پس از گذشت ۷۲ ساعت منجر به مرگ نیمی از سلول‌های TCC گردید در حالیکه این غلظت‌ها هیچ اثر کشندگی بر روی سلول‌های HDF اعمال نکردند. بررسی اثرات آسیب زننده DNA این ترکیب نشان داد که غلظت ۶۵ µg/ml آن سبب القاء ۳۲/۶۸٪ آسیب در DNA سلول‌های سرطانی شد، که به طور معنی‌داری ($P<0.001$) بیشتر از اثر DMSO بود و هیچ اختلاف معنی‌داری بین سلول‌های تیمار نشده و سلول‌های تیمار شده با DMSO مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت، 7-isopentenyloxycoumarin دارای سمیت سلولی بر روی سلول‌های TCC است. بررسی مکانیسم اثر آن بر روی این سلول‌ها با استفاده از comet assay نشان داد که این ترکیب آسیب DNA را القاء نموده و می‌تواند به عنوان یک عامل ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد، هر چند مطالعات بیشتر در این زمینه مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: *7-isopentenyloxycoumarin، سلول‌های TCC، MTT assay، آسیب DNA، comet assay.*

Code:O23

7-isopentenyloxycoumarin induces DNA damage in bladdercancercells *in vitro*

Fereshteh Haghighi[1], *Maryam M. Matin[1, 2]*, Ahmad Reza Bahrami[1, 2], Mehrdad Iranshahi[3].

1- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Introduction: Coumarins are a large group of natural compounds, which are mainly found in the families Rutaceae and Apiaceae. In the last decade it has been shown that prenyloxycoumarins, as secondary metabolites, have valuable biological activities. For instance, 7-isopentenyloxycoumarin, a type of prenyloxycoumarins, has shown promising anti-cancer, anti-inflammatory, anti-fungal and anti-microbial effects. This compound can be either extracted from plants or chemically synthesised and this property makes it an interesting compound for further investigations. Here we report the DNA-damaging effects of 7-isopentenyloxycoumarin on TCC cells *in vitro*.

Methods: 7-isopentenyloxycoumarin was synthesised by reaction between isopentenyl bromide and hydroxycoumarin at room temperature in the presence of acetone and was then purified by column chromatography. TCC cells (as cancerous cells) and HDF cells (as normal cells) were grown and treated with 10 to 100 µg/ml concentrations of this compound. Equivalent percentages of dimethylsulfoxide (DMSO) were used as controls. Cell viability was measured 24, 48 and 72 hours after treatments by MTT assay.

The DNA-damaging activity of 7-isopentenyloxycoumarin was quantified using comet assay. Untreated cells and cells treated with DMSO were used as controls. Each cell was analysed with "TriTek Cometscore version 1.5" software and the DNA damage was reported as percent tail DNA.

Results: Results showed that 7-isopentenyloxycoumarin reached its IC50 at concentration of 65 µg/ml after 72 hours on TCC cells. On the other hand, it did not have any cytotoxic effect on HDF cells. Investigating the DNA-damaging effect of this compound on TCC cells showed that 65 µg/ml 7-isopentenyloxycoumarin can induce DNA lesion by 32.68%, significantly ($P < 0.001$) higher than DMSO control, and no significant difference was observed among cells treated with DMSO and untreated cells.

Conclusion: The results indicated that 7-isopentenyloxycoumarin had cytotoxic effects on TCC cells. Exploring the mechanism of this action on cancerous cells by comet assay revealed that 7-isopentenyloxycoumarin can induce DNA lesion. Therefore, 7-isopentenyloxycoumarin might be considered as an anti-tumour agent. More investigations are required to confirm the reproducibility and mechanism of these observations in other cell lines.

Key words: *7-isopentenyloxycoumarin, TCC cells, MTT assay, DNA damage, comet assay.*