



بررسی اثرات ضد سرطانی ۶-ژرانیل اکسی کاربوستریل بر روی سلول های سرطان پروستات

مهرداد آقاسی زاده شعرفاف^۱، احمدرضا بهرامی^{۱،۲،۳}، حمید صادقیان^۴، مریم مقدم متین^{۱،۲،۳*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه پژوهشی تشخیص ها و درمان های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه پژوهشی سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۴. مرکز تحقیقات التهابی نوروزنیک، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

imehrdad20@gmail.com

چکیده

سرطان پروستات یکی از سرطان های رایج در جهان و وابسته به سن و جنس است. احتمال بروز این سرطان با افزایش سن در مردان افزایش می یابد و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع منجر به مرگ می شود. کاربوستریل ها از یک گروه بزرگ مشتقات کوئینولون تشکیل شده اند که حاوی یک ساختار ۲ حلقه ای ناهمسان می باشند. با توجه به خواص ضد سرطانی کاربوستریل، ساختار این مولکول به عنوان پایه ای در طراحی و کشف داروهای مهار کننده رشد سرطان استفاده می شود. در این پژوهش، اثرات ضد سرطانی ۶-ژرانیل اکسی کاربوستریل بر روی سلول های PC3 و DU145 (سرطان پروستات) و همچنین HDF (فیبروبلاست پوست انسان) از طریق آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون MTT مشخص کرد که مقادیر IC₅₀ این ترکیب بر روی سلول های PC3 و DU145 بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب (۴۳، ۲۲ و ۲۰ μg/ml) و (۳۵، ۵۶ و ۵۱ μg/ml) بود. این نتایج برای سلول های HDF در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با (۲۱۸، ۲۶۶ و ۲۷۰ μl/ml) تعیین گردید. به علاوه با استفاده از آزمون PI-Annexin V چگونگی القا مرگ سلولی توسط ماده 6-gq مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که 6-gq مرگ سلولی را در سلول های سرطان پروستات با استفاده از فعال کردن مسیر آپوپتوز القا می کند. در نهایت، نتایج ما نشان می دهند که 6-gq می تواند به عنوان یک ماده ضد سرطانی قوی معرفی گردد. بررسی چگونگی القا مرگ سلولی توسط این ترکیب مزیت آن را نسبت به داروهای نکرود دهنده نشان می دهد. پژوهش در شرایط درون تنی می تواند در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، سمیت سلولی، کربوستریل، آپوپتوز، HDF

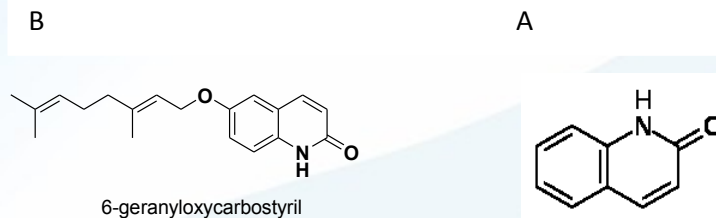
مقدمه

سرطان پروستات یکی از مهمترین علل بیماری و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، مرگ در مردان است (۱۲). هر ساله ۱/۶ میلیون مرد در دنیا به سرطان پروستات مبتلا می شوند و ۳۶۶۰۰۰ نفر به علت این سرطان جان خود را از دست می دهند (۱۳ و ۱۲). لازم به ذکر است در ایران سرطان پروستات به عنوان سومین سرطان شایع در مردان و ششمین سرطان شایع هردو جنس شناخته می شود (۱۱). سرطان پروستات یکی از سرطان های وابسته به سن و جنس است به گونه ای که در





مردان با افزایش سن احتمال بروز آن افزایش می یابد (۸). کاربوستریل ها (2-quinolinone یا 2-quinolone) (شکل ۱) از یک گروه بزرگ مشتقات کوئینولون تشکیل شده اند (۱۶). کربوستریل ها ساختار ۲ حلقه ای ناهمسان دارند که از یک حلقه بنزن و یک حلقه لاکتام آروماتیک ۶ وجهی تشکیل شده است و دارای چندین جایگاه مختلف باقابلیت جانسینی توسط گروه های جایگزین است (۴).



کوئینولون ها به عنوان یک گروه مهم از عوامل ضد میکروبی به صورت وسیع در درمان عفونت های انسانی کاربرد دارند (۳ و ۷). کربوستریل ها این امکان را دارند که به عنوان یک ساختار شیمیایی مهارکننده آنزیمی (۹)، مهارکننده رشد سلول های سرطانی (۲)، یک ماده ضدالتهاب غیراستروئیدی (۵) و همچنین یک داربست جهت قرارگیری گروه های مختلف در طراحی و کشف داروها عمل کنند (۱۶). در این پژوهش، به بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی مشتق ۶-ژرانیل اکسی کربوستریل بر روی رده های سلولی PC3 و DU145 در مقایسه با سلول های طبیعی HDF پرداخته شد. همچنین سازوکار القای مرگ سلولی توسط ماده 6-gq مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

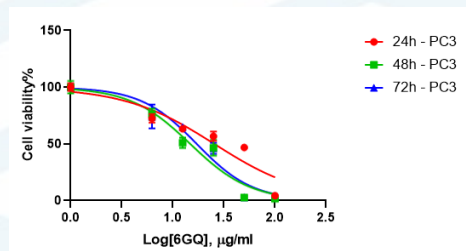
به جهت بررسی اثرات سمیت سلولی ترکیب 6-gq، سلول های سرطان پروستات PC3، DU145 و سلول های طبیعی HDF با غلظت های متفاوتی از ماده مورد نظر تیمار شده و سپس توسط آزمون MTT زنده مانی سلول ها مورد بررسی قرار گرفت. برای هر رده سلولی ۳ گروه تیمار نشده، تیمار شده با حلال DMSO و تیمار شده با غلظت های متفاوت از مواد مورد نظر بررسی گردید (۱۷). در این آزمون از داروی سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۰). در آزمون MTT جهت بررسی اثر سمیت سلولی 6-gq بر روی رده های سلولی مورد بحث در طی زمان های مختلف، به ازای هر ترکیب از سه ظرف کشت ۹۶ خانه ای جهت بررسی اثر مواد در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ استفاده گردید، بعد از اثر دادن تیمارهای مختلف، به محیط کشت هر خانه ۲۰ μ l محلول MTT اضافه شده و پس از گذشت ۴ ساعت، محیط کشت هر خانه خارج و با ۱۵۰ μ l حلال DMSO جایگزین شد تا بلور های فورمازان حل شوند. در نهایت، جذب نوری هر خانه در طول موج ۵۴۵ nm اندازه گیری شد (۱۵). جهت تعیین درصد سلول های زنده در هر غلظت، میانگین جذب نوری سلول های تیمار شده با ماده بر میانگین جذب نوری سلول های تیمار شده بر حلال DMSO در همان غلظت تقسیم شده و حاصل آن در عدد ۱۰۰ ضرب می شود. غلظت موثر ترکیب سمی توسط کمیته به نام IC_{50} معرفی می گردد که برابر با غلظتی است که در آن نیمی از سلول ها زنده و نیمی دیگر می میرند. به منظور محاسبه IC_{50} برای مواد مورد نظر و سیس پلاتین و همچنین رسم نمودار ها از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده شد. همچنین جهت انجام آزمون PI-Annexin V، سلول های PC3 در ظروف ۶ خانه کشت داده شد و بعد از زمان مشخص شده با توجه به مقادیر IC_{50} ، ترکیب 6-gq با غلظت ۲۰ μ g/ml اثر داده شد. سلول



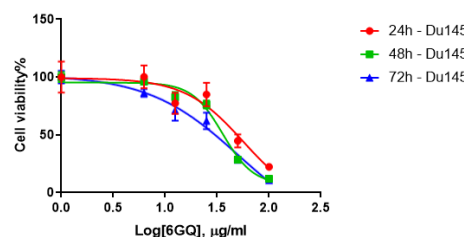
ها پس از کنده شدن توسط cell scraper و اثر دادن رنگ های PI-Anexxin V متصل به FITC، توسط دستگاه فلوسایتومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۴). به علاوه جهت حذف نشر حاصل از اتصالات غیراختصاصی رنگهای متصل شونده و همچنین اثر حلال DMSO از نمونه های شاهد استفاده گردید. همچنین از سیس پلاتین به منظور مقایسه با ماده موردنظر به عنوان کنترل مثبت بهره گرفته شد. در نهایت نتایج حاصل بوسیله نرم افزار FlowJo 7.6.1 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

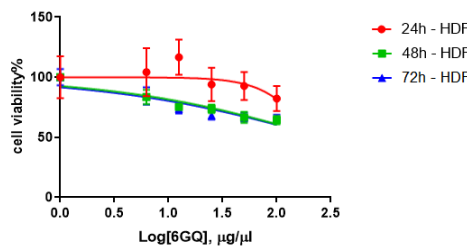
به منظور ارزیابی اثرات سمیت سلولی 6-gq و تعیین مقادیر IC_{50} این ماده بر روی رده های سلولی PC3، DU145 و HDF از آزمون MTT استفاده شد. ترکیبات مورد نظر با غلظت های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به همراه سلول های تیمار نشده مورد بررسی قرار گرفتند. با بدست آمدن نتایج و رسم نمودار دوز-پاسخ توسط نرم افزار Prism 8، مقادیر IC_{50} این ترکیبات بر روی سلول های PC3 و DU145 پس از گذشت بازه های زمانی مدنظر به این صورت گزارش گردید: (۲۲، ۴۳) و (۲۰ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ و (۳۵، ۵۶) و (۵۱ $\mu\text{g}/\text{ml}$) محاسبه شد. همچنین مقدار IC_{50} ماده 6-GQ برای سلول های HDF پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب (۲۱۸، ۲۶۶ و ۲۷۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$) تعیین شد. (نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶).



نمودار 1: نمودار دوز-پاسخ اثر 6-gq بر روی سلول های PC3. منحنی تغییرات درصد زنده ماندن سلول ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با ماده 6-gq را نشان می دهد. داده ها میانگین ۳ بار تکرار درصد زنده ماندن سلول ها در هر غلظت به همراه SEM است.

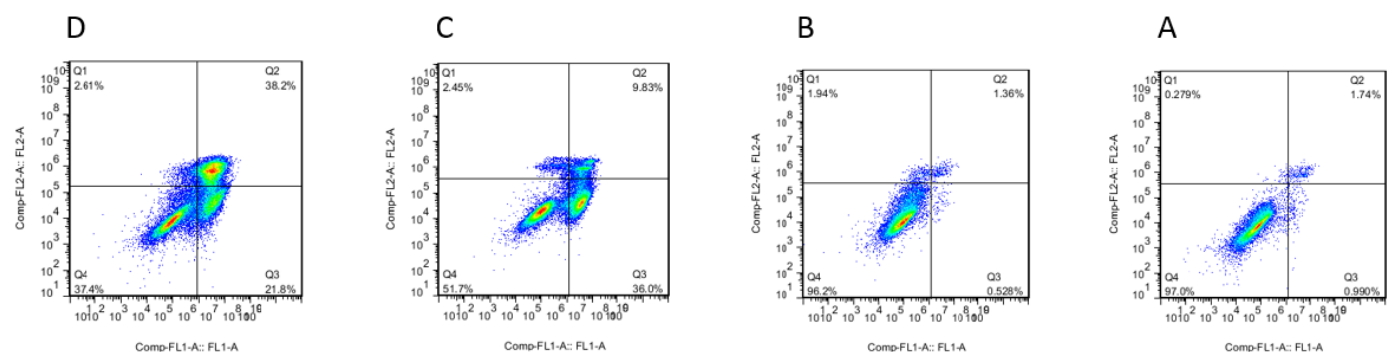


نمودار 2: نمودار دوز-پاسخ اثر 6-gq بر روی سلول های DU145. منحنی تغییرات درصد زنده ماندن سلول ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با ماده 6-gq را نشان می دهد. داده ها میانگین ۳ بار تکرار درصد زنده ماندن سلول ها در هر غلظت به همراه SEM است.



نمودار 3: نمودار دوز-پاسخ اثر 6-gq بر روی سلول های HDF. منحنی تغییرات درصد زنده ماندن سلول ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با ماده 6-gq را نشان می دهد. داده ها میانگین ۳ بار تکرار درصد زنده ماندن سلول ها در هر غلظت به همراه SEM است.

با توجه به نتایج حاصل شده از آزمون MTT می توان نتیجه گرفت که ماده 6-gq می تواند به عنوان یک عامل قوی ضد سرطانی عمل کند. مقادیر کمتر سمیت سلولی 6-gq بر روی سلول های طبیعی HDF در مقایسه با سیس پلاتین، به عنوان یک مزیت برای این ماده به جهت کاهش اثرات جانبی بر روی سلول های طبیعی محسوب می شود. نتایج حاصل از آزمون PI- V Annexin نیز مشخص کرد که ترکیب 6-gq همانند سیس پلاتین اثر کشندگی بر روی سلول های PC3 داشته با این تفاوت که نسبت به سیس پلاتین القا مرگ سلولی را بیشتر از مسیر آپوپتوز فعال می کند، چراکه سلول های بیشتری نسبت به شاهد در مرحله آپوپتوز اولیه قرار دارند (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی سلول های PC3 با PI-Anexin v متصل به FITC و بررسی نمونه ها با دستگاه فلوسیتومتری. A: سلول های تیمار نشده؛ B: سلول های تیمار شده با DMSO؛ C: سلول های تیمار شده با 6-gq؛ D: سلول های تیمار شده با سیس پلاتین

این امر باعث می شود تا برای این ترکیب برتری نسبت به سایر داروها همچون سیس پلاتین قائل شد که می تواند منجر به اثرات جانبی کمتر در بدن شود. بررسی اثرات این ماده در مدل های جانوری سرطان پروستات می تواند در مطالعات بعدی مورد نظر قرار بگیرد.

منابع

1- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.



- 2- **Chen, I.-L., Chen, J.-J., Lin, Y.-C., Peng, C.-T., Juang, S.-H., & Wang, T.-C. (2013).** Synthesis and antiproliferative activities of N-(naphthalen-2-yl)acetamide and N-(substituted phenyl)acetamide bearing quinolin-2(1H)-one and 3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 227–234.
- 3- **Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003).** The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(90001), 13–20.
- 4- **Hinderaker, M. P., & Raines, R. T. (2003).** An electronic effect on protein structure. *Protein Science*, 12(6), 1188–1194.
- 5- **Kalkhambkar, R. G., Kulkarni, G. M., Kamanavalli, C. M., Premkumar, N., Asdaq, S. M. B., & Sun, C. M. (2008).** Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2178–2188.
- 6- **Linder, J. A., Huang, E. S., Steinman, M. A., Gonzales, R., & Stafford, R. S. (2005).** Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *The American Journal of Medicine*, 118(3), 259–268.
- 7- **Mitscher, L. A. (2005).** Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews*, 105(2), 559–592.
- 8- **Mohammadian, M., Salehiniya, H., & Mohammadian-Hafshejani, A. (2017).** Some Facts on Incidence and Mortality of Cancer in Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 46(10), 1446–1447.
- 9- **O'Brien, N. J., Brzozowski, M., Wilson, D. J. D., Deady, L. W., & Abbott, B. M. (2014).** Synthesis and biological evaluation of substituted 3-anilino-quinolin-2(1H)-ones as PDK1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(14), 3781–3790.
- 10- **Price, P. M., Yu, F., Kaldis, P., Aleem, E., Nowak, G., Safirstein, R. L., & Megyesi, J. (2006).** Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(9), 2434–2442.
- 11- **Pakzad, R., Rafiemanesh, H., Ghoncheh, M., Sarmad, A., Salehiniya, H., Hosseini, S., ... Afshari-Moghadam, A. (2016).** Prostate Cancer in Iran: Trends in Incidence and Morphological and Epidemiological Characteristics. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 17(2), 839–843.
- 12- **Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018).** The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), a030361.
- 13- **Rawla, P. (2019).** Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63–89.
- 14- **Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011).** Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (50)
- 15- **Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012).** MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796.
- 16- **Tashima, T. (2015).** The structural use of carbostyryl in physiologically active substances. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3415–3419.
- 17- **van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011).** Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 731, pp. 237–245).

Investigating anti-cancer effects of 6-geranyloxycarbostyryl on prostate cancer cells

Mehrdad Aghasizadeh¹, Ahmad Reza Bahrami^{1,2,3}, Hamid Sadeghian⁴, Maryam M. Matin^{1,2,3*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

4. Neurogenic Inflammation Research Center, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I. R. Iran.

Imehrdad20@gmail.com

Abstract

Prostate cancer is one of the most common cancers in the world, which is dependent on age and sex. Prostate cancer incidence increases with age in men and, if not diagnosed and treated in time can lead to death. Carbostyryles are composed of a large group of quinolone derivatives that contain a dissimilar 2-ring structure. Due to anti-cancer properties of carbostyryl, the structure of this molecule is used as the basis for designing and discovery of novel anti-cancer drugs. In this study, anti-cancer effects of 6-geranyloxycarbostyryl on PC3 and DU145 (prostate cancer cell lines) and also HDF (human dermal fibroblast cells) were evaluated by MTT assay. The result of MTT assay indicated that the IC₅₀ values of this compound on PC3 and DU145 cells after 24, 48 and 72 hours were 43, 22 and 20 µg/ml, and 56, 35 and 51 µg/ml after 24, 48 and 72 h, respectively. for HDF cells, the IC₅₀ values were determined to be 218, 266, and 170 µl/ml, respectively. Apoptosis inducing effects of 6-gq is an advantage of this agent compared to necrotic drugs. The mechanism of cell death induced by 6-gq was further investigated using PI-Annexin V double staining. Results of flowcytometry indicated that 6-gq could induced cell death in prostate cancer cells via apoptosis. Finally, our results demonstrate that 6-gq can be introduced as a potent anti-cancer agents. Research in animal models can be considered in later studies.

Keyword : prostate cancer, carbostyryl, cell cytotoxicity, apoptosis, HDF