

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

بررسی اثرات ضدسرطانی مشتقات فارنسیل اکسی کربوستریل بر روی رده سلولی سرطان پروستات انسانی (PC3) در شرایط برون تنی

طیبه مقدم^۱، احمد رضا بهرامی^{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 تشخیصی و درمان‌های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- گروه پژوهشی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۴- مرکز تحقیقات التهابی نوروز نیک، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: moghaddamtayebe@yahoo.com

چکیده:

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان مردان جهان می‌باشد. بروز این سرطان در ده سال اخیر در کشور ایران افزایش داشته است. داروهای شیمی درمانی رایج در بازار همچون سیسپلاتین علاوه بر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، برای سلول‌های سالم بدن نیز سمی هستند. به همین علت مطالعاتی بر مبنای رابطه بین ساختار-فعالیت^۱ در تلاشند تا ترکیبات ضد سرطانی موثرتر و بهینه‌ای را کشف کنند. هدف از مطالعه ما بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیبات ۶ و ۷ و ۸-فارنسیل اکسی کربوستریل (7fc, 6fc, 8fc) بر روی سلول‌های سرطان پروستات انسانی (PC3) و سلول‌های فیبروبلاست انسانی (HDF) از طریق آزمون‌های MTT و PI/annexin V می‌باشد. علاوه بر آن، تجزیه و تحلیل‌های ساختاری این ترکیبات با روش‌های مدل‌سازی نیز صورت گرفت. میزان زنده‌مانی سلول‌ها از طریق آزمون MTT سنجیده شد که در طی آن، سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های افزایشی 6fc و 8fc تیمار شدند و نتایج IC₅₀ ساعت ۴۸ این ترکیبات بر روی سلول‌های PC3 به ترتیب ۳۲/۴۶ و ۲۶/۳۵ و برای سلول‌های HDF ۹۳/۴۷ و ۱۱۶/۱ بدست آمد. ترکیب 7fc در تمامی غلظت‌ها در حلال DMSO انحلال پذیری بسیار پایینی داشت و در همه غلظت‌ها رسوب ایجاد شد. ترکیب 8fc بخاطر اثر کشندگی بیش‌تر برای مطالعات بعدی انتخاب شد. برای تعیین نوع مرگ سلولی از آزمون PI/annexin V استفاده شد، که در طی آن مقایسه نمودارهای تیمار شده 6fc, 8fc و شاهد، آپوپتوز سلولی را اثبات کردند. به طور کلی، نتایج نشان دادند که ترکیب 8fc می‌تواند به عنوان یک عامل شیمی درمانی مناسب برای تیمار سرطان پروستات در آینده به شمار آید. برای ادامه، می‌توان اثرات ضد سرطانی 8fc را در مدل حیوانی سرطان پروستات و بر روی دیگر رده‌های سلولی سرطانی پروستات بررسی کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، PC3، فارنسیل اکسی کربوستریل، شیمی درمانی

^۱ Structure-activity relationship (SAR)

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن میکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

مقدمه

سرطان پروستات یکی از سرطان‌های رایج در میان مردان جهان می‌باشد (Schatten, 2018). سرطان پروستات پس از سرطان ریه و روده، سومین عامل مرگ و میر بخاطر سرطان در میان مردان آمریکایی به شمار می‌آید (Schatten, 2018). احتمال بروز این سرطان در بین مناطق جغرافیایی مختلف، تفاوت‌های چشمگیری دارد، به طوری که بین کشورهایی با کمترین و بیشترین بروز، یک تفاوت ۲۵ برابری مشاهده می‌شود (Ferlay et al., 2010). در ده سال گذشته در ایران، احتمال بروز سرطان پروستات افزایش داشته و رایج‌ترین سرطان در میان سرطان‌های وابسته به هورمون می‌باشد (Mojahedian et al., 2019). برای اولین بار در سال ۱۹۴۱ Charles Huggins دریافت که سرطان پروستات متاستاتیک، به درمان با قطع اندروژن^۲ پاسخ مثبت می‌دهد (Huggins, 1941). اما سرطان پروستات، در نهایت ولی نه در همه موارد، به سمتی پیش می‌رود که نسبت به هورمون درمانی مقاوم^۳ می‌شود، در حالیکه دلایل دقیق آن هنوز نامعلوم مانده است. شبکه جامع سرطان ملی ایالات متحده آمریکا^۴، شیمی درمانی ترکیبی^۵ را به عنوان یک گزینه درمانی برای بیماران که مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به هورمون^۶ هستند، توصیه کرده است (Scherr et al., 2003). از معایب داروهای شیمی درمانی می‌توان به آسیب رساندن به بافت‌های سالم، ایجاد مقاومت دارویی و یا اثرات جانبی آن‌ها در بدن اشاره نمود (Joensuu, 2008). درمان هدفمند سرطان یکی از روش‌های موفق و گسترده برای تیمار انواع زیادی از سرطان‌ها می‌باشد. درمان سرطان از طریق هدف‌گیری اختصاصی یک مسیر مولکولی خاص، باعث کاهش اثرات سمی و میزان آسیب به بافت‌های سالم می‌شود. یکی از زیرمجموعه‌های عمده هدف درمانی سرطان پروستات، استفاده از مهارکننده‌های مولکولی کوچک است که می‌توانند به تنهایی و یا به صورت ترکیبی به عنوان پایه اصلی شیمی درمانی این بیماری مورد استفاده قرار گیرند (Vhang, 2005). با توجه به تحقیقات انجام شده، ترکیبات 5-, 7-, 8- farnesyloxycoumarin از طریق مهار فعالیت آنزیم 15-LOX-1 نقش خود را در مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات ایفاء می‌کنند (Orafaie et al., 2017; Saboormaleki et al., 2018; Hosseinymehr et al., 2016).

کربوستریل به عنوان یک جزء ساختاری مهم، نه تنها در فرآورده‌های طبیعی و فرآورده‌های سوخت و سازی دومین^۷ وجود دارد، بلکه به صورت مکرر در مواد مصنوعی همچون مواد فعال از لحاظ زیستی مانند داروها و مواد فلورسانت مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک ترکیب به شدت جذاب در طراحی و کشف دارو می‌باشد (Tashima, 2015). هیدرازون‌های^۸ حاوی کربوستریل، ویژگی‌های ضدانگلی، ضد باکتری توپرکلوزیس، ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد قارچی،

^۲ Androgen ablation therapy

^۳ Hormone refractory stage

^۴ The National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

^۵ Combination chemotherapy

^۶ Hormone-refractory prostate cancer (HRPC)

^۷ Secondary Metabolism Products

^۸ Hydrazone

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

ضد دیابت، کاردیوتونیک^۹، ادرار آوری و گشاد کننده‌گی برونش^{۱۰} از خود نشان می‌دهند (Decker & Schwartz, 1985; Joseph et al., 2002; Milecki et al., 1987; Park et al., 2010; Raitio et al., 2006) به بررسی مشتقات کربوستریل پرداخته‌اند شامل این موارد می‌باشند: تیمار لنفوم T-cell پوستی^{۱۱} (Tashima, 2015)، مهارکننده آنزیم‌های MAO-B^{۱۲} و MAO-A انسانی، برای تیمار بیماری پارکینسون (Meiring et al., 2013)، ضد کارسینومای نازوفارنکس^{۱۳} (Meiring et al., 2013) و در مطالعه‌ای، همانند داروهای NSAIDs^{۱۴}، به عنوان مهارکننده التهاب مورد استفاده قرار گرفته است (Kalkhambkar et al., 2008). در این طرح به اثرات ضد سرطانی مشتقات 6-, 7- and 8-farnesyloxycarbostyryl بر روی رده سلولی سرطان پروستات انسانی (PC3) و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست انسانی (HDF) در شرایط برون‌تنی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و پاساژ سلولی

سلول‌های PC3 و سلول‌های HDF به ترتیب در محیط کشت‌های RPMI 1640 و DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ و ۹۵٪ رطوبت گرمخانه گذاری شدند. جهت پاساژ سلول‌ها، بافر PBS و محلول trypsin-EDTA برای جداکردن سلول‌ها از کف فلاسک مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی زنده مانی سلولی با استفاده از آزمون MTT

در این روش، ابتدا ۸×۱۰^۳ سلول PC3 و HDF در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، با غلظت‌های افزایشی ترکیبات 6fc و 8fc به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از آن، ۲۰ μl محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پس از ۴ ساعت گرمخانه گذاری، محتویات هر خانه دور ریخته و ۲۰۰ μl محلول DMSO اضافه شد. میزان جذب حاصل از نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و توسط دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری و توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 6.0 تجزیه و تحلیل شد. برای اندازه‌گیری درصد سلول‌های زنده در هر غلظت، میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده با ماده بر میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده با همان درصد از حلال، تقسیم شده و عدد حاصل در 100 ضرب شد.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{[\text{OD (compounds)} - \text{OD (blank)}]}{[\text{OD (control)} - \text{OD (blank)}]} \times 100$$

^۹ Cardiotonic

^{۱۰} Bronchodilator

^{۱۱} Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)

^{۱۲} Monoamine oxidase-B

^{۱۳} Nasopharyngeal carcinoma (NPC)

^{۱۴} Non-steroidal anti-inflammatory drugs

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

بررسی ساز و کار مرگ سلولی با استفاده از آزمون PI/annexin V

برای این آزمون به میزان ۳۰۰۰۰۰ سلول در هر خانه از ظرف ۶ خانه‌ای مورد نیاز است. سلول‌ها با غلظت ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ و ۲۰ از ترکیبات 6fc و 8fc تیمار شدند. برای حذف نشر حاصل از رنگ‌های متصل شده به‌طور غیر اختصاصی به سلول‌ها و همچنین حذف اثر حلال (DMSO)، از نمونه‌های شاهد استفاده گردید و مدت زمان اثر دهی 8fc بر سلول‌ها به‌صورت تجربی، زمان ۲۰ ساعت انتخاب شد. بر اساس دستور کار ارائه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت آپوپتوز (Annexin V) به همراه PI)، برای انجام آزمون، حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت ($10^7 \times 0.25$) cells/mL در بافر اتصال Annexin V مورد نیاز است. به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون، ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و ۱۰ میکرولیتر PI افزوده شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس، میکروتیوب‌ها به روی یخ منتقل و محتویات داخل آن‌ها با دستگاه فلوسیتومتر با طول‌موج ۴۸۸ nm و با فیلتر ۵۳۳/۳۰ (FL1) برای Annexin V-FITC و فیلتر ۵۸۵/۴۰ (FL2) برای PI بررسی شد (www.biolegend.com). نتایج حاصل از فلوسیتومتری به‌وسیله‌ی نرم‌افزار FlowJo7.6.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج آزمون MTT

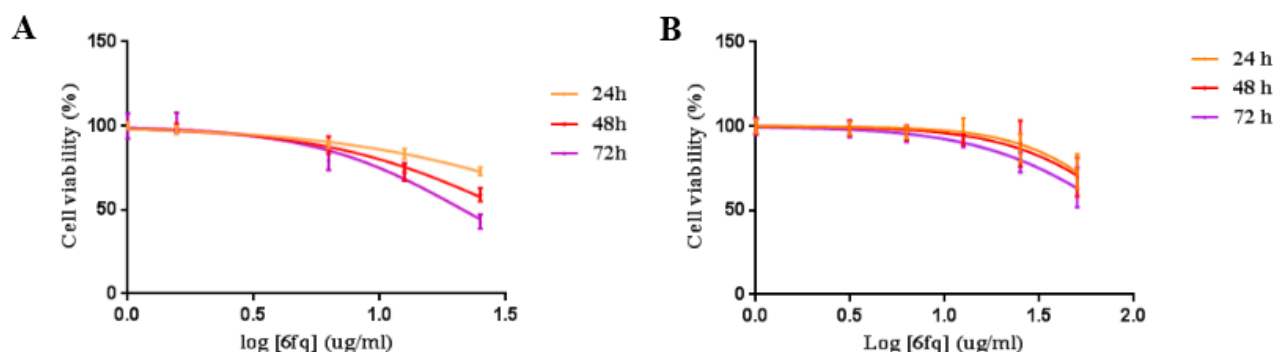
رده‌های سلولی PC3 و HDF تحت تاثیر غلظت‌های افزایشی ($3/125$ ، $6/25$ ، $12/5$ و 25) از ترکیب 6fc و ($3/125$ ، $6/25$ ، $12/5$ ، 25 ، 50 و 100) از ترکیب 8fc قرار گرفتند و IC_{50} ترکیبات 6fc و 8fc پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به شرحی که در جدول ۱ آورده شده است، بدست آمد. در تمامی غلظت‌های 7fc رسوب مشاهده شد و بنابراین از نتایج صرف نظر گردید. نتایج زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با ترکیبات 6fc و 8fc نیز به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: مقادیر IC_{50} ترکیبات 6fc و 8fc بر حسب $\mu\text{g/mL}$ و بر روی سلول‌های PC3 و HDF پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار

	Compounds	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), 24 h	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), 48 h	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), 72 h
PC3	6fc	73.17	32.46	21.40
	8fc	42.28	26.35	19
HDF	6fc	93.47	90.63	78.22
	8fc	166.6	116.1	109.3

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

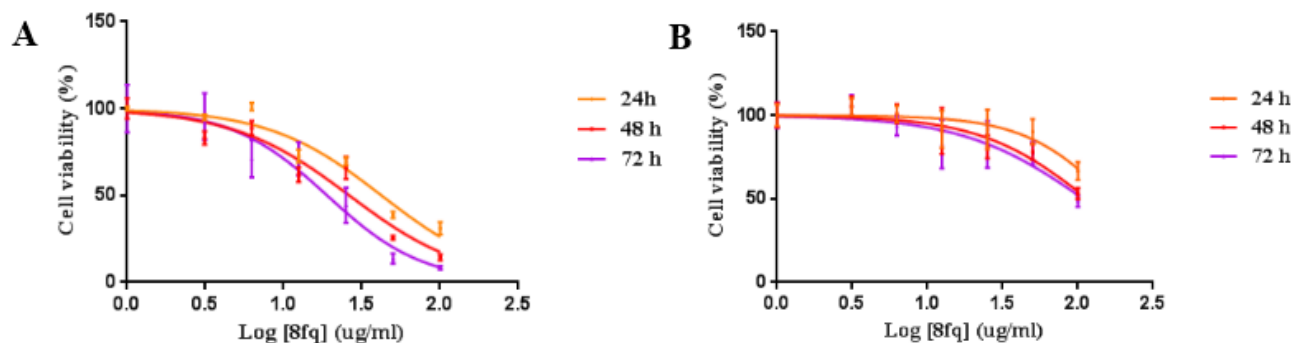


نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف 6fq بر روی بقای رده‌های سلولی PC3 (A) و HDF (B) در سه بازه زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج بدست آمده حاصل از ۳ تکرار برای هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

نتایج آزمون PI/Annexin V

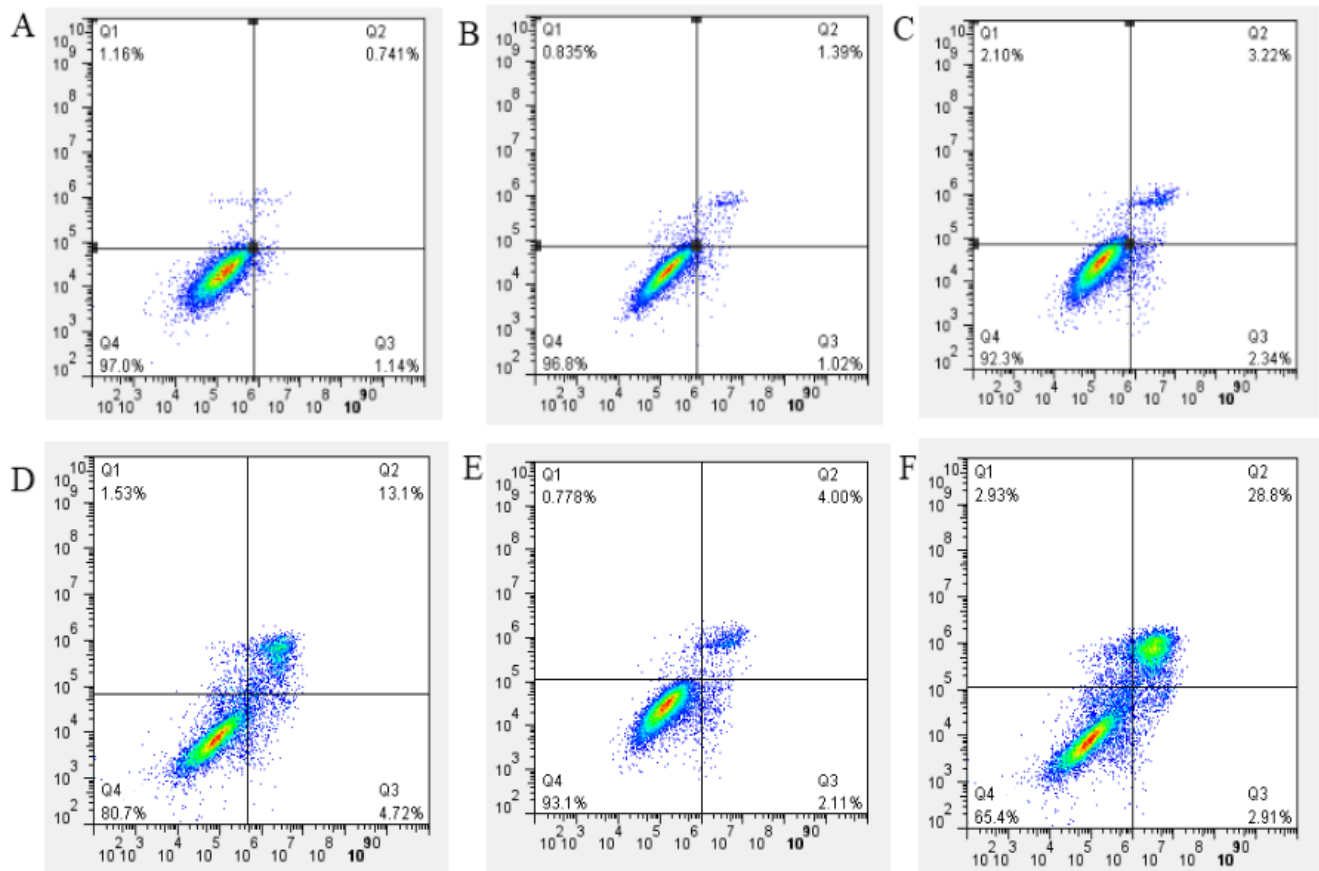
با توجه به نتایج حاصل از فلوسیتومتری، مقایسه نمودارهای شاهد و تیمار شده با ترکیبات 6fc و 8fc نشان می‌دهند که میزان سلول‌هایی که در مراحل ابتدایی آپوپتوز هستند نسبت به شاهد بیشتر شده که این امر آپوپتوز سلولی را اثبات می‌کند. نتایج نشان می‌دهند که بعد از تیمار رده سلولی PC3 با ترکیب 8fc، آپوپتوز سلولی با درصد بالاتری نسبت به ترکیب 6fc مشاهده می‌شود. نمودار ۳ نشان دهنده نتایج مربوط به فلوسیتومتری ترکیبات 6fc و 8fc بر روی رده سلولی PC3 می‌باشد.

نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف 8fc بر روی بقای رده‌های سلولی PC3 (A) و HDF (B) در سه بازه زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج بدست آمده حاصل از ۳ تکرار برای هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.



خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران



نمودار ۳: نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سلول‌های PC3 با PI و Annexin V متصل به FITC و بررسی نمونه‌ها با فلوسیتومتری. A: تیمار نشده؛ B: تیمار شده با DMSO؛ C: تیمار شده با 6fc (10 µg/mL)؛ D: تیمار شده با 6fc (20 µg/mL)؛ E: تیمار شده با 8fc (10 µg/mL)؛ F: تیمار شده با 8fc (20 µg/mL). FL1-A (محور افقی) میزان رنگ‌پذیری با FITC و FL2-A (محور عمودی) میزان رنگ‌پذیری با PI را نشان می‌دهد.

با بررسی اثرات سمیت سلولی ترکیبات 6fc و 8fc آشکار شد که جایگاه زنجیره فارنسیل بر روی حلقه کربوستریل، تاثیر مهمی در مقدار کشندگی بر روی سلول‌های PC3 و HDF دارد. سمیت سلولی این ترکیبات با داروی رایج سیس پلاتین قابل

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن مدیکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

مقایسه می‌باشد در حالیکه اثرات سمیت کمتری بر روی سلول‌های طبیعی HDF دارند. با مطالعات بیشتر در زمینه رابطه ساختار-اثر 8fc، داکینگ مولکولی برای تشخیص هدف اختصاصی آن، کشف مسیر سیگنالی و ساز و کار القای آپوپتوز توسط این ترکیب و مطالعات تکمیلی در مدل‌های حیوانی امید است بتوان در آینده به ترکیبات موثرتری نسبت به سیسپلاتین دست یافت. روی هم رفته نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب 8fc را می‌توان گزینه مناسبی برای شیمی درمانی سرطان پروستات در آینده نزدیک به شمار آورد.

References

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917.

Hosseinymehr, M., Matin, M. M., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., & Kaseb-Mojaver, N. (2016). 8-Farnesyloxycoumarin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells by inhibition of 15-lipoxygenase-1 enzymatic activity. *Anti-cancer drugs*, 27(9), 854-862.

Huggins, C. (1941). Studies on prostatic cancer. II. The effect of castration on clinical patients with carcinoma of the prostate. *the Archive of Surgery (Arch. Surg.)*, 43, 209.

Joensuu, H. (2008). Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment. *The Lancet Oncology*, 9(3), 304.

Joseph, B., Darro, F., Béhard, A., Lesur, B., Collignon, F., Decaestecker, C and Kiss, R. (2002). 3-Aryl-2-quinolone derivatives: Synthesis and characterization of in vitro and in vivo antitumor effects with emphasis on a new therapeutical target connected with cell migration. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2543–2555.

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.

Leclerc, G., Marciniak, G., Decker, N. and Schwartz, J. (1985). Cardiotoxic Agents. 1. Synthesis and Structure-Activity Relationships in a New Class of 3-, 4-, and 5-Pyridyl-2(1H)-quinolone Derivatives. *The Journal of Medical Chemistry*, 111(15), 2427–2432.

Meiring, L., Petzer, J. P., & Petzer, A. (2013). Inhibition of monoamine oxidase by 3, 4-dihydro-2(1H)-quinolinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(20), 5

خلاصه مقالات پوستر پزشکی

هجدهمین کنگره سراسری انجمن میکال انکولوژی و هماتولوژی ایران

498-5502.

Milecki, J., Baker, S. P., Standifer, K. M., Ishizu, T., Chida, Y., Kusiak, J. W., & Pitha, J. (1987). Carbostyryl Derivatives Having Potent β -adrenergic Agonist Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30(9), 1563–1566.

Mojahedian, M. M., Toroski, M., Keshavarz, K., Aghili, M., Zeyghami, S., & Nikfar, S. (2019). Estimating the Cost of Illness of Prostate Cancer in Iran. *Clinical Therapeutics*, 41(1), 50-58.

Orafaie, A., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., Saboormaleki, S., & Matin, M. M. (2017). 5-farnesyloxycoumarin: a potent 15-LOX-1 inhibitor, prevents prostate cancer cell growth. *Medicinal Chemistry Research*, 26(1), 227–234.

Park, H. S., Jung, S. J., Kwak, J. H., Choi, D. R., & Choi, E. C. (2010). DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of zabofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), 97–98.

Raitio, K. H., Savinainen, J. R., Vepsäläinen, J., Laitinen, J. T., Poso, A., Järvinen, T., & Nevalainen, T. (2006). Synthesis and SAR studies of 2-oxoquinoline derivatives as CB2 receptor inverse agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(6), 2022–2027.

Saboormaleki, S., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., Orafaie, A., & Matin, M. M. (2018). 7-Farnesyloxycoumarin exerts anti-cancer effects on a prostate cancer cell line by 15-LOX-1 inhibition. *Archives of Iranian Medicine*, 21(6), 251-259.

Schatten, H. (Ed.). (2018). *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer: Updates, Insights and New Frontiers* (Vol. 1095). Springer, p.129.

Scherr, D., Swindle, P. W., & Scardino, P. T. (2003). National Comprehensive Cancer Network guidelines for the management of prostate cancer. *Urology*, 61(2), 14-24.

Tashima, T. (2015). The structural use of carbostyryl in physiologically active substances. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3415-3419.

Vhang, C. (2005). *Prostate cancer Basic Mechanisms and Therapeutic Approaches*. World Scientific, 2005.