هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی
جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران- پژوهشگاه نیرو
The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep. 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran

# بررسی اثرات سمیت سلولی یکی از مشتقات تری آزولوپیریمیدین روی سلول های کارسینومای مثانه و مری

**ناهید ارغیانی*[1]، مریم مقدم متین[1,2]، احمد رضا بهرامی[1,2]، فاطمه بهنام رسولی[1]، محمد رحیمی زاده[3] ، علی شیری[3]، مهدی بکاولی[3]، محبوبه سیاهکوهی نیا[3]**

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران na_ar922@stu_mail.um.ac.ir

۲گروه پژوهشی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده:

سرطان مثانه و مری از جمله رایج ترین بدخیمی های دستگاه ادراری تناسلی و گوارشی می باشند. علی رغم تحقیقات پی در پی در مورد سرطان معده و مری پیشرفت در درمان این بیماران با موفقیت چشمگیری روبرو نبوده است. در این تحقیق ابتدا ترکیب ۴-آمینو-۵-برومو-۲-کلرو-۶-متیل پیریمیدین با استفاده ازچندین واکنش شیمیایی سنتز گردید. سپس اثر سمیت سلولی بر روی سلول های سرطانی مثانه و مری بررسی گردید. بدین منظور غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ از ماده ی فوق بر روی سلول های TCC و KYSE30 اثر داده شد. به منظور ارزیابی بهتر هر تیمار، سلول ها با غلظت های مشابهی از DMSO که حلال ماده ی مذکور بودند، به عنوان کنترل تیمار شدند. تغییرات مورفولوژیک و میزان مرگ و میر سلول ها ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بر روی سلول های TCC و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بر روی سلول های KYSE30 مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات مورفولوژیک نشان دادند که سلول ها پس از تیمار در مقایسه با گروه کنترل و سلول های تیمار نشده به شکل کروی با سیتوپلاسمی گرانوله شده در آمده بودند. بررسی های حاصل از انجام تست MTT نیز نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر سلولی ۷۲ ساعت پس از تیمار در سلول های TCC در غلظت۸۵ µg/ml و ۴۸ ساعت پس از تیمار در سلول های سرطان مری در غلظت 100 µg/ml بود.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، سرطان مری، سرطان مثانه

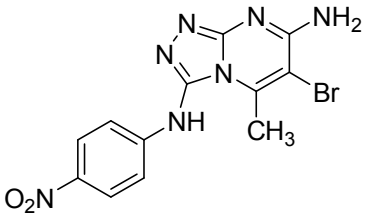
مقدمه:

سرطان مثانه چهارمین سرطان رایج در مردان و هشتمین سرطان رایج در بین زنان است. کارسینومای سلول ترانزیشنال (TCC) در بیش از ۹۰٪ انواع پاتولوژیکی تومورهای مثانه مشاهده می شود. تقریبا ۸۰٪-۷۵ تومورهای مثانه سطحی و به صورت غیر مهاجم به ماهیچه می باشند. درمان سرطان به روش های متنوعی صورت می گیرد که از آن جمله می توان به روش های جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، پیوند مغز استخوان، بکارگیری مهار کننده های آنژیوژنز و ژن درمانی اشاره نمود [1]. در این میان شیمی درمانی یکی از پر سابقه ترین و رایج ترین روش های درمان سرطان است که اگرچه در مراحل ابتدایی تجویز، نتایج رضایت بخشی به دنبال دارد، اما بکارگیری طولانی مدت آن بدلیل مقاوم شدن سلول های سرطانی با شکست مواجه می شود. هسته های پیریمیدینی به عنوان گروهی از ترکیبات هتروسیکلیک ( ناجور حلقه) همراه با کاربردهای زیستی فراوان هستندکه به طور گسترده به عنوان عوامل ضد درد، مسکن، ضد افسردگی و تب بر استفاده می شوند [2]. علاوه بر این فعالیت های ضد التهابی[3]، ضد ویروسی [4]، ضد HIV-1 [5]، ضد میکروبی [6] و ضد توموری [7,8] هتروسیکل های حاوی بخش پیریمیدین نیز گزارش شده اند. در پژوهش حاضر اثرات سمیت سلولی یک هتروسیکلیک پیریمیدین دار سنتزی به نام ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-

[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین بر روی سلول های کارسینومای مثانه (TCC) و مری (KYSE30) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها:

ترکیب ۴-آمینو-۵-برومو-۲-کلرو-۶-متیل پیریمیدین با استفاده از روش گزارش شده ی قبلی سنتز گردید [9]. سپس از واکنش این پیش ماده با هیدرازین هیدرات، کلر موقعیت ۲ توسط هیدرازین جایگزین شده و محصول ۵-برومو-۲-هیدرازینیل-۶-متیل پیریمیدین با بازده خوبی بدست آمد. در ادامه از واکنش محصول هیدرازینی بدست آمده با ۴-نیتروفنیل ایزوتیوسیانات در حلال استونیتریل جوشان محصول ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین (شکل ۱) بدست آمد.



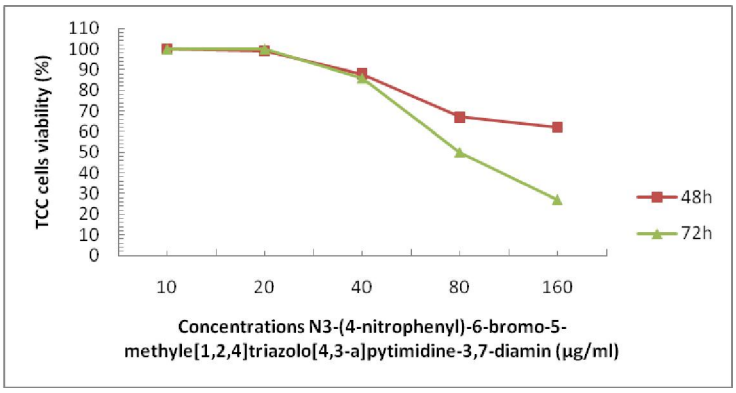

شکل۱- ساختار شیمیایی ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین

سلول های TCC و KYSE30 از انیستیتو پاستور تهران خریداری شدند. سلول های TCC در محیط DMEM همراه با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی و سلول های KYSE30 در محیط RPMI/Ham's F12 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی و در دمای ۳۷°C و ۵٪ $co_2$ کشت شدند. به طور خلاصه، سلو ل ها (به ترتیب ۱۳۰۰۰ و ۸۰۰۰ سلول TCC و KYSE30 در هر خانه) در پلیت ۹۶ خانه ای ۲۴ ساعت قبل از تیمار کشت شدند. به منظور بررسی سمیت سلولی ماده ی فوق، سلول ها با غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ µg/ml از این ماده تیمار شدند. به منظور ارزیابی بهتر هر تیمار، توانایی زنده ماندن هر گروه با کنترل مربوط به همان گروه که حاوی مقدار مشابهی از DMSO بود مقایسه گردید. میزان مرگ و میر سلولی پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. ماده ی فوق دارای خاصیت آنتی اکسیدان می باشد و می تواند به طور مستقیم با رنگ MTT برهمکنش دهد. به منظور رفع این مشکل در طی این ارزیابی قبل از افزودن رنگ MTT محیط کشت خانه ها خارج شد و ۲۰۰ µg/ml محیط جدید به هر خانه افزوده شد. سپس ۲۰ µl از رنگ MTT تهیه شده (5 mg/ml) در هر یک از خانه ها ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس محتویات خانه ها تخلیه و ۱۵۰ µl محلول DMSO به هر یک از خانه ها افزوده شد. بکارگیری DMSO به عنوان حلال بلور های فورمازان (محصول حاصل از متابولیزه شدن MTT) باعث ایجاد شدت های متفاوتی از شدت رنگ بنفش تا سفید شد. سپس جذب خانه ها در طول موج 540 nm توسط دستگاه ELISA reader اندازه گیری شد.

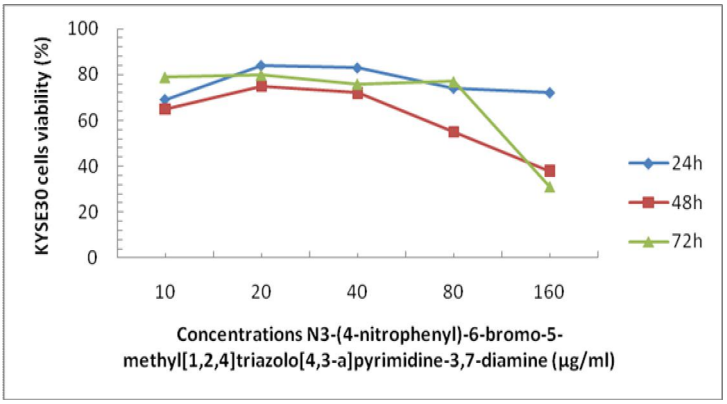
نتیجه گیری و بحث:

در این مطالعه نشان دادیم که ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین در غلظت ۸۵ µg/ml پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول های TCC و پس از گذشت ۴۸ ساعت در غلظت ۱۰۰ µg/ml بر روی سلول های KYSE30 باعث مرگ ۵۰٪ سلول ها گردید (شکل های ۲ و ۳). لازم به ذکر است که این نتایج به وسیله مشاهدات مورفولوژیکی نیز تایید شدند (شکل ۴). از آنجا که تغییر در ساختار شیمیایی مشتقات تری آزولو پیریمیدین ممکن است سبب افزایش سمیت

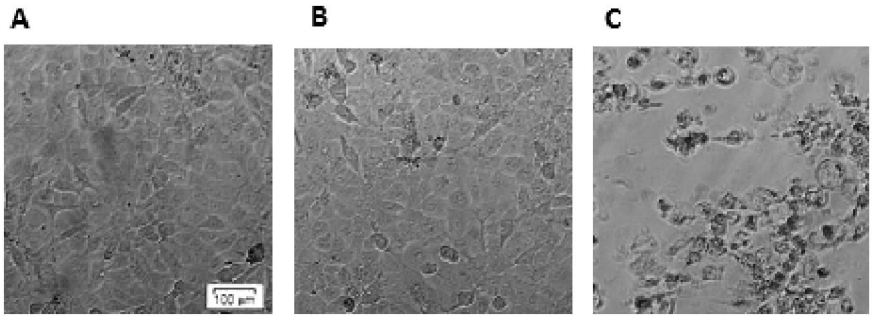
سلولی و یا اختصاصیت این مواد بر روی انواع سلول های خاصی گردد، این ماده می تواند به عنوان یک ترکیب سمی در مطالعات *in vivo* و *in vitro* آینده مورد نظر قرار گیرد.




شکل۲- منحنی دوز پاسخ ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین سلول های TCCبعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت




شکل۳- منحنی دوز پاسخ ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین سلول های KYSE30 بعد از گذشت۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت




شکل ۴- مورفولوژی سلول های KYSE30: A) سلول های تیمار نشده، B) تیمار شده با DMSO 0.5% و C) تیمار شده با غلظت 100 µg/ml ۶-برومو-۵-متیل-(۴-نیتروفنیل)-[۴،۲،۱]تری آزولو[۴،۳-a ] پیریمیدین-۷،۳-دی آمین

منابع:

**1-Konoshima, T., Takasaki, M., 2000. Anti-tumor-prmoting activities (cancerchemopreventive activities) of nature products. Studies in Natural Products Chemistry. 24: 215-26.**

**2- N. Hafez, H., B. A. El-Gazzar, A.R., 2009. Synthesis and antitumor activity of substituted triazolo[4,3-a]pyrimidin-6-sulfonamide with an incorporated thiazolidinone moiety. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19: 4143–4147.**

**3- Gavrilov, M. Y., Mardanova, I. G., Kolla, V. E., Konshin, M. E. Pharm., 1988. Synthesis, antiinflammatory and analgesic activities of 2-arylamino-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-3-carboxamides. Pharmaceutical Chemistry Journal. 22: 554-556.**

**4- Dinan, FJ., Bardos TJ., 1980. Synthesis of some new S-alkylated derivatives of 5-mercapto-2'-deoxyuridine as potential antiviral agents. Medicinal Chemistry. 23, 569-572.**

**5- Tanaka, H., Baba, M., Ubasawa, M., Takashima, H., Sekiya, K., Nitta, I., Shigeta Sh , T., Walker, R., De Clercq, E., Miyasaka, T., 1991. Synthesis and anti-HIV activity of 2-, 3-, and 4-substituted analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). Medicinal Chemistry. 34: 1394-1399.**

**6- Dinan, FJ., Bardos, TJ., 1980. Synthesis of some new S-alkylated derivatives of 5-mercapto-2'-deoxyuridine as potential antiviral agents. Medicinal Chemistry. 23: 569-572.**

**7- Hendry, J. A., Homer, R. F., 1952. New cytotoxic agents with tumour-inhibitory activity. Part I. Some aziridinopyrimidine derivatives. Journal of the Chemical Society. 328-333.**

**8- Cordeu, L., Cubedo, E., Bandres, E., Rebollo, A., Saenz, X., Chozes, H. M., Dominquez, V., Echeverria, M., Mendivil, B., Sanmartin, C., Palop, J. A., Font, M., Garcia-Foncillas, J. Bioorg., 2007. Biological profile of new apoptotic agents based on 2,4-pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 15:1659–1669.**

**9- Bakavoli, M., Nikpour, M., Rahimizadeh, M., 2006. New access to thiazolo[4,5-d]pyrimidine derivatives. J. Heterocycl. Chem. 43: 1327-1329.**

The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep. 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran
هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران- پژوهشگاه نیرو

# Investigating the cytotoxic effects of a triazolopyrimidine derivative on carcinoma cells of the bladder and KYSE30

Nahid Arghiani[a], Maryam M. Matin[a,b], Ahmad Reza Bahrami[a,b], Fatemeh Behnam Rasouli[a], Mohammad Rahimizadeh[c], Ali Shiri[c], Mehdi Bakavoli[c], Mahboobeh Siahkoohinia[c]

[a]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[b]Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[c]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

**Abstract**

Bladder cancer is the most common urologic cancer and is the forth most common cancer among men, accounting for approximately 200,000 new cases per year worldwide. Recent clinical and epidemiologic observations have suggested that the number of patients with esophagus adenocarcinomas may be on the rise. In thise research, 6-bromo-5-methyl-$N^3$-(4-nitrophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidine-3,7-diamine was first synthesized and then cytotoxic effects of this compound were investigated in TCC and KYSE30 cells as an *in vitro* model for bladder and esophagus tumours.

TCC and KYSE30 Cells were treated with different concentrations of 6-bromo-5-methyl-$N^3$-(4-nitrophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidine-3,7-diamine and DMSO as control. After 24, 48 and 72 h cell viability was quantified by MTT assay and morphological changes were observed under microscope. The microscopic observations also revealed that the morphology of cells was changed to spherical forms with granulated cytoplasm in comparison to controls.

Our results revealed that 6-bromo-5-methyl-$N^3$-(4-nitrophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidine-3,7-diamine could reach its half maximal inhibitory concentration(IC50) at 80 µg/ml after 72h of treating TCC cells. Moreover, the IC50 was calculated as 100 µg/ml on KYSE30 cells after 48h of treatment. Thus 6-bromo-5-methyl-$N^3$-(4-nitrophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidine-3,7-diamine derivative can be considered as toxic compound for future *in vitro* and *in vivo* studies.

**Keywords:** *6-bromo-5-methyl-$N^3$-(4-nitrophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidine-3,7-diamine, Cytotoxicity, Bladder cancer, Esophagus cancer.*