طراحی، سنتز و ارزیابی بیولوژیک مشتقات پلی آروماتیک فنانترو (۹ و ۱۰-e)(۱ و ۲ و ۴) تری آزین حاوی استخلاف آریلیدین هیدرازون در موقعیت ۳ حلقه ی تری آزین به عنوان ترکیبات جدید ضد سرطان

محمد حسن جامعی، مهدی خوشنویس زاده[۱و۲]، رامین میری[۱و۲]، امیدرضا فیروزی[۲]، حسین صادق پور[۱]

[۱] گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۲] مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

معرفی و پیش زمینه : سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان است . این بیماری هنگامی ایجاد می شود که سلول های نرمال در قسمتی از بدن به گونه ای غیر قابل کنترل شروع به تقسیم می کنند . اگرچه مرگ و میر ناشی از سرطان کاهش یافته است، پیشرفت ها در درمان سرطان به اندازه ی پیشرفت هایی که در درمان سایر بیماری های مزمن مشاهده می شود، موثر نیست . برای درمان موفق سرطان ما به داروهایی نیاز داریم که آپوپتوز را در سلول های سرطانی فعال کنند . آپوپتوز قوی ترین سیستم دفاعی طبیعی بدن علیه سرطان به حساب می آید. پروتئین های ضد آپوپتوز تحت عنوان Bcl-2 امروزه به عنوان اهداف اصلی روش های جدید درمان سرطان مطرح هستند . به همین جهت تلاش برای تولید مواد مه ار کننده ی Bcl-2، حائز اهمیت است.

روش انجام کار: در این مطالعه یک چارچوب ساختاری جدید جهت اتصال به پروتئین Bcl-2 و مهار این پروتئین طراحی شده است. ۱۲ مشتق مختلف با ساختار فنانترن تری آزین حاوی استخلاف های آروماتیک گوناگون بر روی قسمت هیدرازون در طی چهار مر حله سنتز شدند . در مرحله ی اول توسط واکنش جانشینی نوکلئوفیلی میان فنانترن ۹و۱۰ دی اون تیوسمی کاربازید، حلقه ی تری آزین شکل گرفت که در مرحله ی دوم با متیل یدید واکنش داده و استخلاف متیل تیول را بر روی حلقه ی تری آزین ایجاد کرد . سپس در اثر واکنش این ماده ی حد واسط با هیدرازین هیدرات، بخش هیدرازونی جایگزین متیل تیول شده و در مرحله ی چهارم، افزودن آلدهیدهای آروماتیک حاوی استخلاف های مختلف به فرآورده ی مرحله ی سوم منجر به تولید محصولات نهایی گردید . پس از خالص سازی، با استفاده از روش های مختلف اسپکتروسکوپی نظیر ^{1}H-NMR، طیف سنجی IR، و طیف سنجی جرمی ساختار مشتقات سنتز شده مورد تایید قرار گرفت. جهت ارزیابی فعالیت بیولوژیک ترکیبات از تست تعیین سمیت سلولی MTT استفاده شد. با استفاده از این تست، سمیت سلولی مشتقات ساخته شده بر روی رده های سلولی HT-29 و MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی وضعیت اتصالی ترکیبات سنتز شده در برهم

کنش با جایگاه فعال آنزیم Bcl-2، فرآیند داکینگ مولکولی توسط نرم افزار AutoDock 4.2 انجام شده و نتایج توسط نرم افزارهای MOE و ViewerLite مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: ارزیابی نتایج مطالعات بیولوژیک سمیت بسیار بالایی برای مشتقات سنتز شده نشان دادند، به گونه ای که بهترین IC_{50} بر روی رده ی HT-29، که یکی از سرطان های بسیار مقاوم به درمان است، برابر با 7.6 ± 0.8 (µM) و بر روی رده ی MCF-7 برابر با 5.8 ± 0.7 (µM) به دست آمد که هر دو عدد از مقادیر مربوط به سیس پلاتین کوچک تر بودند . مطالعات داکینگ مولکولی نیز مؤید برهم کنش های مؤثری میان ترکیبات فوق الذکر با پروتئین Bcl-2 بوده و همچنین انرژی اتصال و ثابت مهاری قابل قبولی برای ترکیبات نشان داد به گونه ای که بهترین انر ژی اتصال و ثابت مهاری به ترتیب (kcal) 8.96- و (nM) 272.16 به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری: مقایسه ی نتایج تست بیولوژیک با نتایج داکینگ مولکولی به خوبی نشان گر رابطه ی میان مقدار IC_{50} و انرژی آزاد اتصال ترکیبات است به گونه ای که برای ترکیب 9f، که مقادیر IC_{50} آن بر روی رده های HT-29 و MCF-7 به ترتیب برابر با 15.3 ± 1.5 (µM) و 5.8 ± 0.7 (µM) به دست آمده، انرژی آزاد اتصال معادل (kcal) 8.96- و ثابت مهاری اتصال برابر با (nM) 272.16 محاسبه شده است. عمده ترین بر هم کنش های مشاهده شده شامل پیوندهای هیدروژنی میان آمینوا سید Arg132 با نیتروژن های حلقه ی تری آزین و پیوندهای π-π stacking میان آمینواسیدهای Phe105 و Tyr101 با قسمت های آروماتیک ساختار، نظیر فنانترن و فنیل موجود بر زنجیره ی جانبی، می باشد . این پیوندها در اتصال بهتر ساختار با پروتئین نقش داشته و موجب افزایش اثر سایتوتوکسیک می گردد. از داده های حاصل چنین نتیجه می شود که ترکیبات سنتز شده در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک بسیار خوبی بر روی رده های سرطانی مختلف نظیر HT-29 و MCF-7 داشته و در صورت انجام مطالعات اختصاصی تر نظیر تست های سایتوتوکسیک اختصاصی برای Bcl-2 و نیز تست های بیولوژیک بررسی اثرات اینترکالیتوری DNA و فرآیندهای داکینگ بر روی DNA، می توانند به عنوان ترکیبات اساسی در درمان سرطان مطرح شوند.

کلمات کلیدی: فنانترو (۹ و ۱۰-e)(۱ و ۲ و ۴) تری آزین، سرطان، Bcl-2، تست MTT، HT-29، MCF-7.

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Polyaromatic Phenanthro (9, 10-e)(1, 2, 4) Triazine Derivatives Containing Different Arylidine Hydrazone Moieties at C3 Position of Triazine Ring as Novel Cytotoxic Agents

Mohammad Hasan Jamei, Mehdi Khoshneviszadeh[1,2], Ramin Miri[1,2], Omidreza Firuzi[2], Hossein Sadeghpour[1]

[1]Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

[2]Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Introduction and Background: Cancer is the second leading cause of death in the world. It starts when normal cells in some parts of the body begin to devide out of control. Despite the decreasd rate of mortality, advances in cancer is significantly less efficient than other chronic diseases. Apoptosis is the most powerful defense system against cancer, so the compounds with apoptosis inducing properties can be of interest. Today, antiapoptotic proteins named Bcl-2 are the major targets for modern cancer therapy methods.

Method: In this study, a new scaffold was designed to interact with and inhibit the Bcl-2 protein. 12 derivatives with the phenanthrene triazine structure bearing different substitutions on hydrazone moiety were synthesized in 4 steps. First, the triazine ring was formed via a nucleophilic substitution reaction between phenanthrene 9,10 dione and thiosemi carbazide, which reacted with methyliodide in the second step and formed methyl thiol group on the triazine ring. Then, the product of the previous step reacted with hydrazine hydrate and the methyl thiol group was replaced by hydrazine group to form hydrazone structure. In the last step, different aldehydes interacted with the last compound to synthesize the final products. After purifying the final products, they were determined and confirmed by means of different spectroscopy methods including NMR, IR-spectroscopy and MS. MTT assay were performed on two cell lines (HT-29 and MCF-7) to assess cytotoxic properties of the products. In order to evaluate the binding modes of the products with Bcl-2 active site, molecular docking was performed using AutoDock 4.2 and the results were further analyzed by MOE and ViwerLite softwares.

Results: The results of the biological assays shows high cytotoxic properties for synthesized products. The best IC_{50} value for the HT-29 cell line (which is one of the most resistant cancers) and MCF-7 cell line were 7.6 ± 0.8 (µM) and 5.8 ± 0.7 (µM), respectively. Molecular docking studies also revealed drastic interactions between the

5.8 ± 0.7 (µM) for MCF-7 cell line, binding free energy and inhibition coefficient were calculated -8.96 (kcal) and 272.16 (nM), respectively. The main interactions contain

hydrogen binding of Arg132 with triazine nitrogens, and π-π stacking interaction of Phe105 and Tyr101 with aromatic moieties of the structure like phenanthrene or phenyl part of the substitution. These interactions amplify the interaction between ligand and protein, and so increase the cytotoxic effects of the compound. It can be concluded that the synthesized products have high cytotoxic effects on HT-29 and MCF-7 cell lines and can be suggested as essential structures in cancer therapy if the more specific biological evaluations for Bcl-2 and DNA-intercalation properties, and the molecular docking procedures on DNA confirm their cytotoxicity and specificity.

Keywords: Phenanthro (9, 10,-e)(1, 2, 4) triazine, Cancer, Bcl-2, MTT assay, HT-29, MCF-7