مقایسه اثر سمیت برخی فسفرآمیدها بر روی رده سلول سرطان خون K562

نیلوفر درستی[1]، خدایارقلی‌وند[2]، نرگس درستی[3]
1- مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
2-گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- بیمارستان شهدای عشایر، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره سیزدهم / شماره 4 / زمستان 90 / مسلسل 50

چکیده

دریافت مقاله: 90/5/3 ، پذیرش مقاله: 90/6/16

Ø مقدمه: فسفرآمیدهایی با چارچوب عمومی -C(O)NHP(O)- به علت کاربردهای مختلف در زمینه بیوشیمی و کشاورزی مورد توجه بسیاری قرارگرفته‌اند. این ترکیبات با ساختار شبه پپتیدی دارای خواص بیولوژیکی هستند و مهارکننده آنزیم‌های استیل‌کولین‌استراز و اوره‌آز می‌باشند. از طرف دیگر ویژگی‌های دارویی و استریوشیمی حلقه‌های شش‌تایی شامل فسفر و همچنین نقش فعال آنها به عنوان آنالوگ‌های سیکلوفسفامید مورد توجه است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر موقعیت استخلاف نیترو روی حلقه فنیل همچنین قرار گرفتن گروه NH بین فنیل و کربونیل در ترکیبات اوره‌ای بر سمیت این ترکیبات در مقابل سلول سرطان خون K562 می باشد.

Ø مواد و روش‌ها: در این تحقیق فسفرآمیدهایی از دو دسته کرباسیل آمیدوفسفات (3-1) و N- فسفنیل‌اوره (6-4) با استخلاف نیترو با فرمول عمومی $RC(O)NHP(O)NHCH_2C(CH_3)_2CH_2NH$ (R=2-$NO_2C_6H_4$(1), 3-$NO_2C_6H_4$(2), 4-$NO_2C_6H_4$(3), 2-$NO_2C_6H_4NH$(4), 3-$NO_2C_6H_4NH$(5), 4-$NO_2C_6H_4$(6)) بررسی و مقایسه گردید تا سمیت این ترکیبات در مقابل رده سلول سرطان خون K562 با استفاده از روش MTT ارزیابی شود. سپس ترکیبات با استفاده از نرم افزار Graph Pad PRISM version 5.0 مقایسه گردیدند.

Ø یافته‌ها: نتایج بیولوژیکی به‌دست آمده در محیط آزمایشگاهی نشان دهنده سمیت بیشتر مشتقات با عامل اوره‌ای (6-4) نسبت به ترکیبات دیگر (3 - 1) در برابر سلول‌های سرطانی مطالعه شده است. همچنین نتایج بیانگر این است که مشتقات مورد مطالعه با موقعیت 3-NO_2 (متا) (ترکیبات 2 و 5) سمیت احتمالی بیشتری از موقعیت‌های پارا (ترکیبات 3 و 6) و اورتو(ترکیبات 1و 4) دارند.

Ø بحث و نتیجه‌گیری: از آنجا که پیوندهای هیدروژنی نقش مهمی در ویژگی‌های بیولوژیکی دارد، لذا پیشنهاد می‌شود که افزایش در پیوندهای هیدروژنی مشتقات با عامل اوره‌ای (6-4) ممکن است بیشتر بودن سمیت این مولکول‌ها موثر باشد. علاوه بر این، اثرات فضایی و الکترونی استخلاف نیترو در موقعیت متا ممکن است در بیشتر بودن سمیت این مشتقات از دو موقعیت دیگر موثر باشد.

Ø واژه‌های کلیدی: فسفرآمید،N-فسفنیل‌اوره، سمیت، MTT، سلول K562

آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
پست الکترونیک: nilufardorosti@gmail.com

مقدمه

سرطان یکی از مسائل مهم سلامت انسان است که بر طبق گزارشات انجمن سرطان امریکا در سال 2007 منجر به مرگ 7/6 میلیون انسان شده است. اکثر داروهایی که برای شیمی درمانی به کار می‌روند، سمی هستند و محدودیت‌های متعددی از جمله گزینش‌ناپذیری نسبت به سلول‌های سرطانی، ایجاد مقاومت دارو و ضریب درمانی پایین دارند. یک روش برای بهبود تاثیرات درمانی و کاهش اثرات جانبی معرف‌های ضدسرطانی حاضر، طراحی پیش داروهای ضدسرطان برای فعال‌سازی سایت‌های مخصوص تومر است. این نوع پیش داروهای ضدسرطانی می‌توانند به طور گزینش‌پذیر روی سلول‌های سرطانی عمل کنند و ضریب درمانی را بیش از شیمی درمانی رایج بهبود بخشند. طی چهاردهه گذشته، سیکلوفسفامید یکی از متداول‌ترین پیش داروها در پزشکی شناخته شده و ویژگی‌های منحصر به‌فرد آن نظیر استریوشیمی و صورت‌بندی توجه شیمیدانان را به‌خود جلب نموده است. این ترکیب یکی از موثرترین پیش داروهای ضدسرطان است که برای درمان تومرهای جامد به کار می‌رود (3-1). بنابراین مطالعات متعددی روی توسعه هتروسیکل‌های فسفردار شش‌عضوی (آنالوگ‌های سیکلوفسفامید) به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی‌آنها، مفاهیم استریوشیمی و کنفورمرهای منحصربفرد آنها انجام شده است (6-4).

از طرف دیگر گروهی از مشتقات فسفر تحت عنوان آنالوگ‌های آزا فسفر بتا دی‌کتون شامل دو گروه کربنیل C(O) و فسفریل P(O) به صورت -C(O)NHP(O)- در چارچوب مولکولی خود هستند و مطالعه بر این مولکول‌ها در دهه اخیر توجه محققین بسیاری را جلب نموده است. این مشتقات کاربردهای فراوانی در شیمی، پزشکی و صنعت دارند که می‌توان مهارکننده آنزیم اوره‌آز، حشره‌کش، علف‌کش، مهارکننده آنزیم اپوکسی هیدرولاز، داروی ضدسرطان، خشک‌کننده فیبرهای سلولوزی، آنتی‌اکسیدان، افزاینده در دترجنت‌ها، استخراج یون‌های فلزی، تهیه کمپلکس و ...را نام برد (9-7). این مشتقات دو عاملی بتا دارای سه مرکز دهنده احتمالی P(E)، C(E) و اتم نیتروژن درونی برای تشکیل کمپلکس هستند و ممکن است به عنوان لیگاند تک‌دندانه و دودندانه ظاهر شوند (10). ترکیبات فسفر با وجود تنوع ساختاری موجب فسفریله کردن و ممانعت‌کنندگی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نیز می‌گردند. این ترکیبات دامنه بزرگی از خواص را شامل می‌شوند به طوری‌که برخی از آنها از نظر نحوه عمل بسیار اختصاصی عمل می‌کنند در حالی‌که بعضی دیگر بر گونه‌های مختلف حشرات متفاوت عمل می‌کنند. تعدادی از ترکیبات برای انسان بسیار سمی می‌باشند و برخی دیگر فقط مضرند و تقریبا در انسان به‌صورت غیرسمی عمل می‌کنند. بعضی از ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی[1] غیرسمی بوده اما در متابولیسم بدن حشره و یا گیاه تبدیل به گونه‌های سمی می‌شوند. به‌طورکلی سمیت ترکیبات بستگی به هر دو عامل ساختاری و بخشی از ارگانیسمی دارد که در آن اثر می‌کنند. ترکیبات فسفره دارای سرعت عمل بالا، تاثیر زیاد در غلظت‌های پایین و پایداری کم در محیط زیست هستند و به راحتی به ترکیبات غیرسمی تفکیک می‌گردند.

از آنجاکه امروزه، تغییر سیکلوفسفامید منجر به طراحی و سنتز آنالوگ‌های حلقوی متعددی برای تهیه معرف‌های ضدسرطانی با اثرات جانبی کمتر می‌شود (11)، لذا در این کار تعدادی فسفرآمید که آنالوگ‌های سیکلوفسفامید هستند انتخاب شد و سمیت آنها در مقابل رده سلول خونی K562 با استفاده از روش MTT بررسی و مقایسه قرار گردید.

1.In vitro

مواد و روش‌ها

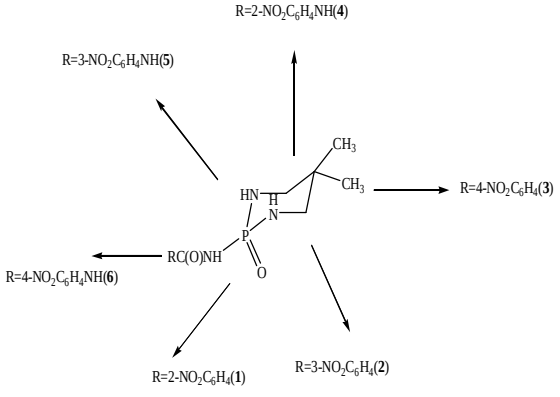
این تحقیق به صورت تجربی انجام شد. فسفرآمیدهایی از دسته کرباسیل‌آمیدوفسفات (3 – 1) و N-فسفنیل‌اوره (6 – 4) از واکنش [R = XC_6H_4; XC_6H_4NH (X = 2-NO_2, 3-4-NO_2)] $RC(O)NHP(O)Cl_2$ با 2،2- دی متیل 1،3 - پروپان دی‌ال در حلال‌های دی‌اتیل‌اتر و استونیتریل در دمای 0°c تهیه شدند و توسط طیف‌های IR، $^{1}H,^{13}C,^{31}P$ NMR وآنالیز عنصری شناسایی شدند را انتخاب نمودیم. داروی معروف سیکلوفسفامید (CP) به عنوان کنترل مثبت به‌کار برده شد. برای ارزیابی فعالیت ضدتکثیری سیکلوفسفامید و ترکیبات (6-1)، سلول K562 در پلیت‌های 96 خانه (5×10^3 سلول در هر چاهک) برای مدت 24 ساعت قبل از افزودن ترکیبات، در RPMI640 با 10% سرم، 2% L-گلوتامین و محلول 1% آنتی بیوتیک-آنتی میوکوتیک در دمای 37 °C در اتمسفری از $5\%CO_2$ قرار گرفتند. ترکیبات آزمایش شده توسط محلول 2% دی‌متیل سولفوکسید حل شد و یک محلول 2% دی‌متیل سولفوکسید نیز به عنوان کنترل منفی به‌کار برده شد. غلظت‌های مختلفی از ترکیبات از 3 mM - 0/01 اضافه و در سه زمان مختلف 24، 48 و 72 ساعت و 3 بار تکرار سمیت آنها اندازه‌گیری شد.

فعالیت بازدارندگی رشد ترکیبات بر سلول سرطانی انتخاب شده (K562) با استفاده از روش MTT بررسی گردید. این آزمایش براساس احیای ماده زرد رنگ 3-(4، 5-دی متیل تیازول-2-ایل)-2، 5-دی‌فنیل تترازولیم بروماید توسط میتوکندریال دی‌هیدروژناز سلول‌های زنده به فورمازون آبی مایل به ارغوانی انجام شد. مقدار رنگ تشکیل شده به تعداد سلول‌های فعال از نظر متابولیت بستگی دارد و توسط دستگاه Eliza Plate Reader در 570 nm خوانده شد. این مقادیر OD در برابر غلظت‌های مختلف هر کدام از ترکیبات توسط نرم افزار Graph Pad PRISM version 5.0 رسم و ثابت‌های بازدارندگی IC_{50} (غلظتی از ترکیب که 50% از فعالیت سلول را مهار کند) برای هر ترکیب اندازه‌گیری شد. لیپوفیلیسیتی ترکیبات با استفاده از نرم افزار محاسباتی ChemDraw Ultra 8.0 به‌دست آمد.

یافته‌ها:

همان‌طور که در شمای 1 نشان داده شده است فسفرآمیدهای 6-1 تحت عنوان کرباسیل آمیدوفسفات(3-1) و فسفینیل اوره‌های(6-4) انتخاب و فعالیت ضدسرطانی اولیه آنها به صورت آزمایشگاهی علیه رده سلولی سرطان خون K562 مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته و نتایج در جدول شماره 1 آورده شده است. داده‌ها در جدول حاکی از این است که مقادیر IC_{50} ترکیبات 3-1 در محدوده µM 5/077 -6/867 و برای ترکیبات 6-4 در محدوده µM 0/171 - 0/49 قرار دارد. بیشترین اثر مهارکنندگی را ترکیبات با چارچوب اوره‌ای (6-4) دارند. مشتقات2 و 5 نیز که دارای گروه نیترو در موقعیت متا هستند اثر سمیت بیشتری را روی سلول‌های سرطان خون K562 در مقایسه با موقعیت‌های ارتو و پارا نشان می‌دهند. نتایج جدول شماره 1 حاکی از این است که ترکیبات فسفینیل اوره 6-4 در طی این تحقیق همانند داروی معروف سیکلوفسفامید (CP) اثر مهارکنندگی بیشتری از خود نشان می‌دهند.

شمای 1. ترکیبات 1-6 انتخاب شده جهت مقایسه سمیت آنها در مقابل رده سلول سرطانی K562



جدول شماره 1. مقادیر IC_{50} و Log P برای ترکیبات 1- 6 و سیکلوفسفامید(CP)

ترکیب	$\delta(^{31}P)^b$(ppm)	IC_{50}(µM)(48h)	Log P[a]
1	2/25	6/867	0/34
2	2/96	5/077	0/34
3	2/86	6/492	0/34
4	2/86	0/49	-0/34
5	3/41	0/171	-0/34
6	3/23	0/173	-0/34
CP	11/53	0/153	1/12

aلیپوفیلیسیتی
bجابجایی شیمیایی فسفر

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق یک سری مشتقات فسفرآمیدی (6 – 1) برای بررسی اثر سمیت آنها بر روی سلول‌های سرطان خون K562 مقایسه شدند. ابتدا آنالوگ‌های طراحی شده، به عنوان معرف‌های داروی احتمالی باید از قوانین لیپینسکی پیروی کنند (12) بدین صورت که:

1-وزن مولکولی ترکیبات کمتر از 500 g/mol باشد.

2- ترکیبات لیپوفیلیسیتی محدودی داشته باشند (Log P< 5).

3-حداکثر شامل5 تا موقعیت دهنده پیوند هیدروژنی باشد (جمع پیوندهای NH است).

4- حداکثر 10 تا موقعیت پذیرنده پیوند هیدروژنی داشته باشد.

در این تحقیق مشتقات انتخاب شده برای تعیین فعالیت بیولوژیکی دارای وزن مولکولی (3-1) 312، (6-4) 327 g/mol و Log P <5 هستند. بدین ترتیب، مولکول‌های مزبور به عنوان معرف-های دارویی احتمالی انتخاب شدند. برای کشف تاثیر قرار گرفتن گروه NH بین حلقه فنیل و گروه کربنیل روی سمیت در مقابل رده سلول انتخاب شده، مولکول‌های 4-6 را انتخاب و با ترکیبات 3-1 مقایسه نمودیم. همان‌طور که در جدول نشان داده شده، قرار دادن NH منجر به افزایش سمیت ترکیبات جدید 4-6 نسبت به کربامیل آمیدوفسفات 3-1 گردیده است. به‌طوریکه مقادیر IC_{50} از 6/867 (ترکیب 1) به 0/49 µM(ترکیب 4) کاهش می‌یابد. همچنین مقدار 5/077 (ترکیب 2) به 0/171 µM (ترکیب 5) و 6/492 (ترکیب 3) به0/173 µM (ترکیب 6) تغییر یافته است.

از آنجا که پیوند هیدروژنی نقش کلیدی را در فرایندهای بیولوژیکی نشان می‌دهد، این نتایج بیانگر آن است که افزایش پیوندهای هیدروژنی مشتقات 6-4 نسبت به ترکیبات 3-1 ممکن است برای برهم‌کنش‌های هدف-میزبان مفید باشد (13، 14).

علاوه بر این، از داده‌های بیولوژیکی آزمایشگاهی نتیجه می‌شود که موقعیت استخلاف نیترو روی حلقه فنیل بر فعالیت این مشتقات در مقابل رده سلولی مذکور تاثیر می‌گذارد. به‌طوری‌که مشتق 2 (با استخلاف 3-نیترو، IC_{50}= 5/077 µM) به ترتیب فعالیت ضدسرطانی بیشتری از مشتق 3 (با استخلاف 4-نیترو، µM IC_{50}= 6/492) و مشتق 1(با استخلاف 2-نیترو، 6/867 µM IC_{50}=) نشان می‌دهد. این روند در ترکیبات 6-4 نیز تکرار شده است. با جایگزینی گروه نیترو در موقعیت متا (ترکیب 5) به موقعیت‌های پارا (ترکیب 6) و ارتو (ترکیب 4) سمیت این مولکول‌ها بر سلول‌های K562 کاهش یافته است. بر اساس داده های بدست آمده ترکیبات آزمایش شده 6-4 فعالیت بیشتری از داروی سیکلوفسفامید (CP) نشان می‌دهند.

نتایج اولیه زمینه مفیدی برای مطالعه بیشتر روی ترکیبات دارای عامل اوره‌ای به عنوان معرف‌های ضدسرطانی احتمالی است. همچنین نتایج زمینه را برای ارزیابی مشتقات در محیط طبیعی فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر بهرام رسولیان سرپرست مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی لرستان برای همکاری و از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی و همراهی در طی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Cao P, Huang XF, Hui D, Ge HM, Li HQ, Ruan BF, Zhu HL. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of substituted urea derivatives as inhibitors of human-leukemia K562 cells, Chem Biodiv. 2007; 4: 881 - 886
2. Sun M, Wu X, Chen J, Cai J, Cao M, Ji M, Design, Synthesis, and in vitro antitumor evaluation of novel diaryl ureas derivatives. Eur. J. Med. Chem, 2010; 45: 2299 - 2306
3. Li H-Q, Lv PC, Yan T, Zhu HL. Urea derivatives as anticancer agents Anticancer Agents Med Chem. 2009; 9: 471 - 480
4. Zalán Z, Martinek TA, LázárL, Fülöp F. Synthesis and conformational analysis of 1,3,2-diazaphosphorino[6,1-a]isoquinolines, a new ring system. Tetrahedron, 2003; 59: 9117 - 9125
5. Frank É , Kazi B, Mucsi Z, Ludányi K, Keglevich G. New steroid-fused P-heterocycles Part II. Synthesis and conformational study of oxazaphosphorino[16,17-e]estrone derivatives. Steroids, 2007; 72: 446
6. Gholivand K, Shariatinia Z, Afshar F, Faramarzpour H, Yaghmaian F. New 1,3,2-diazaphosphorinanes; synthesis, spectroscopic characterization, X-ray crystallography and ab initio calculations. Main Group Chem. 2007; 6: 231 - 248
7. Sanmartín C, Echeverria M, Mendivil B, et al. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers, Bioorg. Med. Chem. 2005; 13 (6): 2031 - 2044
8. Safin DA, Sokolov FD, Nxth H, et al. Studies on zinc(II) complexes with N-thioacylamidophosphates: X-ray crystal structure of the $[Zn(RC(S)NP(O)(OiPr)_2)_2]$ ($R=NH_2$, tBuNH, $c\text{-}C_6H_{11}NH$), Polyhedron, 2008; 27(8): 2022 - 2028
9. Baldwin A, Huang Z, Jounaidi Y, Waxman DJ. Identification of novel enzyme-prodrug combinations for use in cytochrome P450-based gene therapy for cancer. Arch. Biochem. Biophys, 2003; 409: 197 - 206
10. Sokolov FD, Zabirov NG, Yamalieva LN, et al. Coordination diversity of N-Phosphoryl-N'-phenylthiourea (LH) towards CoII, NiII and PdII Cations. Crystal structure of ML_2-N,S and ML_2-O,S chelates. Inorg. Chim. Acta. 2006; 359(7): 2087 - 2096
11. Petitclerc É, Deschesnes RG, CÔté M-F, et al. Cancer Res, 2004; 64: 4654 - 4663
12. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. Bioorg. Med. Chem, 2004; 12: 3581 - 3589
13. Liu S, Xinhua Ji, Gary L, et al. Second-sphere electrostatic effects in the active site of glutathione S-transferase. Observation of an on-face hydrogen bond between the side chain of threonine 13 and the .pi-cloud of tyrosine 6 and its influence on catalysis. J. Am. Chem. Soc. 1993; 115: 7910 - 7911
14. Steiner T, Koellner G. Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: Frequencies and role in stabilizing local 3D structures. J. Mol. Biol. 2001; 305: 535 - 557