Research Paper:

Evaluation of Cytotoxicity and Molecular Docking Studies of Phthalimide and Naphthalimide Derivatives as Potential Anticancer Agents

Negin Ahanj¹, Mehdi Taghavi² , *Ayyub Mojaddami³

1. Toxicology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2. Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Citation Ahanj N, Taghavi M, Mojaddami A. Evaluation of Cytotoxicity and Molecular Docking Studies of Phthalimide and Naphthalimide Derivatives as Potential Anticancer Agents. Jundishapur Journal of Medical Sciences. 2021; 20(4):366-375. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.4.2456>

<https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.4.2456>

Received: 22 Apr 2021

Accepted: 21 Aug 2021

Available Online: 01 Oct 2021

Keywords:

Anti-cancer, Naphthalimide derivatives, Phthalimide derivatives, Molecular docking, MTT test

ABSTRACT

Background and Objectives Cancer is the second leading cause of death in the world after cardiovascular disease, so the aim of the present study was to investigate phthalimide and naphthalimide derivatives in order to develop anticancer compounds.

Subjects and Methods In this study, the cytotoxic activity of six phthalimide and naphthalimide derivatives was evaluated using MTT method on three cancerous cell lines, including breast cancer (MCF-7), ovarian cancer (SKOV3) and lung cancer (A549) cell line. Molecular Docking studies were also performed to determine the binding energy and the compounds interaction with DNA as a possible target of these compounds.

Results Based on MTT results, compound C1, a naphthalimide derivative, showed the highest cytotoxic activity. IC₅₀ values of this compound against MCF-7, SKOV3 and A549 cancer cell lines were 1.7, 6.2 and 9.5 μ M, respectively. Also, comparison of phthalimide and naphthalimide derivatives showed that compounds C1, C3, C5 with carboxyl group had better effects than other compounds, C2, C6, C4, which bearing 5-amidoisophthalic acid moiety.

Conclusion In general, naphthalimide derivatives showed better cytotoxicity than phthalimide derivatives. Compound C1 has the highest cytotoxic activity on all three cancer cell lines and can be further studied in the development of new anti-cancer compounds.

* **Corresponding Author:**

Ayyub Mojaddami

Address: Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 (917) 0457581

E-Mail: mojaddami.a@gmail.com

مقاله پژوهشی:

بررسی سمیت سلولی و مطالعات داکینگ مولکولی بر روی مشتقات فتالیمید و نفتالیمید به عنوان عوامل بالقوه ضد سرطان

نڱين، آهنج، مهدي تقوي^۲ ID، ايوب مجدم^۳ ID

۱. مرکز تحقیقات سم شناسی، مؤسسه تحقیقات علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.
۲. گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳. گروه شیمی دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.

حکیدہ

تاریخ دریافت: ۰۲ اردیبهشت ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۳۰ مرداد ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۹ مهر ۱۴۰۰

زمینه و هدف: سرطان پستان از بیماری‌های قلبی عروقی به عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان شناخته می‌شود. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی مشتقات فتالیمید و نفتالیمید به منظور توسعه ت ترکیبات ضد سرطان است.

روشنی پیرسی در این مطالعه آزمایشگاهی، فعالیت سمیت سلولی ۶ مشتق فتالیمید و نفتالیمیدی با استفاده از روش MTT بر روی ۳ رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)، سرطان تخمدان (SKOV3) و سرطان ریه (A549) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مطالعات داکینگ به منظور تعیین میزان انرژی اتصال و نحوه برهم کنش ترکیبات با DNA به عنوان هدف احتمالی، این ترکیبات، انجام شد.

یافته‌ها بر اساس نتایج MTT، ترکیب C1، مشتق نفتالیمیدی، بیشترین فعالیت سمیت سلولی از خود نشان داد. مقادیر IC50 این ترکیب در برابر رده‌های سلولی سرطانی SKOV3، MCF-7، و A549 به ترتیب معادل ۱/۷، ۶/۲ و ۹/۵ میکرومولار است. همچنین مقایسه مشتقات فتالیمید و نفتالیمید نشان می‌دهد که ترکیبات C3، C5 و C1 دارای بخش کربوکسیل، اثرات بهتری نسبت به سه ترکیب و C4، C2 که دارای بخش ۵-۶-میدوایزوفتالیک اسید هستند، ایجاد می‌کنند.

نتیجه گیری به طور کلی مشتقات نفتالیمیدی سمیت سلولی بهتری نسبت به مشتقات فتالیمیدی ایجاد می کردند. ترکیب C1 بر روی هر ۳ رده سرطانی مورد بررسی از نظر فعالیت سیتوتوکسیک بالاترین اثرات را داشته و می تواند در مسیر آینده توسعه ترکیبات ضد سرطان مورد توجه قرار گرفته و مطالعات بیشتری روی آن صورت گیرد.

کلیدواژه‌ها:

ضد سرطان، مشتقات
نفثالیمیدی، مشتقات
فتالیمیدی، داکینگ
مولکولی، تست MTT

مقدمه

سنتری یافت می‌شوند که این هسته‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت‌های ضد التهابی [۳]، ضد باکتریایی [۴، ۵]، ضد مالاریا [۶]، ضد ویروسی [۷]، مهار آنزیم هیستون داستیلاز [۸، ۹]، آنتی اکسیدانی [۱۰] و ضد سرطان [۱۱-۱۶] به این مشتقات می‌بخشد.

داروهای ضد سرطان اهداف مختلفی دارند که در این میان، DNA همچنان به عنوان هدف مهم برای شیمی‌درمانی سرطان محسوب می‌شود. از این رو، داروهای برهم‌کنش‌کننده با DNA شامل عوامل الکیله‌کننده، عوامل متصل‌شونده به شیار DNA و اینترکلیت‌کننده با DNA در درمان سرطان کاربرد فراوانی پیدا کرده‌اند. یک، از این ترکیبات با توانایی بالقوه در اینترکلیت‌شدن

سرطان یک مسئله عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است که پس از بیماری‌های قلبی‌عروقی به عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان شناخته می‌شود. به طوری که طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی برآورد شده است که تا سال ۲۰۲۵ سالانه بیش از ۱۹/۳ میلیون مرگ در اثر بیماری سرطان رخ دهد [۱]. از این رو توسعه عوامل جدید ضد سرطان با اثرات اختصاصی بالاتر و عوارض جانبی کمتر به عنوان یک هدف عمده در زمینه شیمی دارویی محسوب می‌شود [۲]. هسته‌های فتالیمید و نفتالیمید واحدهای ساختاری مهمی هستند که در تعداد زیادی از آلکالوئیدهای طبیعی و مشتقات

* نویسنده مسئول:

ایوب مجدمی

نفسانی: گروه شیمی، دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، جندی شاپور، اهواز، ایران

تلفن: ۰۴۵۷۵۸۱ (۹۱۷) ۹۸+

ایمانامه: mojaddami.a@gmail.com

بررسی فعالیت سیتوتوکسیک به روش MTT

در این مطالعه تجربی سمیت سلولی ۶ ترکیب فتالیمیدی و نفتالیمیدی در برابر رده‌های سلولی^۱ سرطان تخمدان (SKOV3)، سرطان ریه (A549) و سرطان پستان (MCF7) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده در فلاسک با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا و پس از جمع‌آوری سلول‌ها از کف فلاسک و شست‌وشو با محیط کشت (حاوی ۱۰ درصد آنتی‌بیوتیک و ۱۰ درصد FBS)، تعداد سلول‌های زنده با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. سپس به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی، تعداد ۱۰ هزار سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها، محتویات مربوط به هر چاهک خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیبات با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به صورت ۳ بار تکرار به چاهک‌ها اضافه شد. به ۳ چاهک نیز به عنوان کنترل منفی فقط محیط کشت اضافه شد. همچنین ترکیب دوکسوروبیسین^۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون محلول رویی هر چاهک برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به آن اضافه شد. به دنبال آن میکروپلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس محلول رویی هر چاهک را برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به هر چاهک افزوده شد. میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شد. در نهایت جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به فیلتر مرجع ۶۲۰ نانومتر ثبت شد.

میزان جذب نوری به دست آمده بر اساس فرمول شماره ۱ نسبت به چاهک بلانک نرمال شد و سپس درصد مهارکنندگی نسبت به جمعیت غلظت صفر با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد. آزمون‌های آماری بر روی داده‌های به دست آمده، انجام گرفت.

۱.

$$OD_{Treated} = OD_{Test} - OD_{Blank}$$

$$\text{درصد جمعیت سلولی} = \left(\frac{OD_{Treated}}{OD_{Concentration zero(untreated)}} \right) \times 100$$

بنابراین درصد مهارکنندگی طبق فرمول شماره ۲ محاسبه می‌شود.

۲.

$$\%Inhibition = 100 - \left(\frac{OD_{Treated}}{OD_{(untreated)}} \right) \times 100$$

1. Cell line
2. Doxorubicin

در DNA، مشتقات فتالیمید و نفتالیمید است. طراحی مواد ضد تومور بسیار مؤثر، از اهمیت قابل توجهی در شیمی دارویی برخوردار است. از این رو داروهای ضد سرطان نفتالیمید، محور مهمی در توسعه داروهای ضد سرطان را تشکیل می‌دهند. با کشف اولین ترکیب راهبر نفتالیمیدی، آمونافید (تصویر شماره ۱)، توسط برانا و همکارانش [۱۷، ۱۸] تعداد زیادی از مشتقات نفتالیمید سنتز و فعالیت ضد توموری آن‌ها بر انواع رده‌های سلول سرطانی موش و انسان مورد بررسی قرار گرفت. در این میان ترکیب آمونافید نشان داد که یک عامل اینترکیلیت‌کننده بوده و موجب ایجاد شکست‌های تکرار شونده، دورشته‌ای و همچنین ایجاد اتصال‌های متقاطع بین DNA و پروتئین از طریق تداخل در عملکرد توپوایزومراز II می‌شود [۱۹-۲۱]. از آن پس، به اصلاح اسکلت نفتالیمید توجه زیادی صورت گرفت.

مشتقات اصلاح شده با سیستم چندحلقه‌ای آروماتیک ترکیب شده و یک یا دو زنجیره جانبی ساده انعطاف پذیر به آن اضافه شد. در سال‌های اخیر، داروهای مختلف کونژوگه با اسید آمینه، مانند آنتراکینون کونژوگه شده با اسید آمینه و ۹-هیدروکسی آلپیتیسینیوم گزارش شد (تصویر شماره ۱)، که نتایج امیدوارکننده‌ای در این راه به دست آمد. این نکته به خوبی تبیین شد که اسیدهای آمینه، مواد اولیه ضروری برای رشد سلول و سنتز پروتئین هستند که این اسید آمینه‌ها می‌توانند جذب مواد ضد تومور را بهبود بخشند. بنابراین، یک استراتژی محتمل برای افزایش جذب ترکیبات چربی دوست بیولوژیکی از غشای سلولی، ترکیب با اسیدهای آمینه بود. این مسئله سبب شد تا مشتقات مختلف نفتالیمید ترکیب شده با لوسین به عنوان زنجیره جانبی سنتز شوند. بررسی آزمایش‌های اتصال DNA نشان داد که این مشتقات به عنوان مواد اینترکیلیت‌کننده با DNA عمل می‌کنند [۲۲، ۲۳].

بنابراین با توجه به اهمیت مشتقات نفتالیمید و فتالیمید و با هدف توسعه عوامل ضد سرطان با خواص بیودارویی مطلوب و سمیت پایین، فعالیت سمیت سلولی ۶ ترکیب از مشتقات فتالیمید و نفتالیمید سنتز شده که برخی از آن‌ها دارای اسید آمینه ایزولوسین هستند، به روش MTT روی ۳ رده سلولی سرطانی SKOV3، A549 و MCF-7 توسط تقوی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت [۲۴-۲۶]. همچنین داکینگ مولکولی ترکیبات با DNA به منظور تعیین برهم کنش‌های مهم و مؤثر ترکیبات با هدف، انجام شد.

روش بررسی

در این بخش میزان فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مطالعات برهم کنش ترکیبات با DNA آن‌ها به منظور بررسی دقیق تر مکانیسم احتمالی آن‌ها به عنوان عوامل اینترکیلیت‌کننده DNA، با استفاده از روش‌های مدل سازی مولکولی انجام گرفت.

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۱. ساختار آمونافید، آنتراکینون گونزوگه شده با اسید آمینه و ۹-هیدروکسی الیپتیسینوم

سه گانه مختصات و فاصله نقاط شبکه‌ای ۰/۳۷۵ آنگستروم (یک چهارم طول پیوند ساده کربن-کربن) که دربرگیرنده جایگاه فعال DNA بود، در نظر گرفته شد. مختصات مرکز جعبه نسبت به محورهای x ، y و z به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۲۹ و ۰/۱۸۸ هستند.

اعتبارسنجی فرایند داکینگ

برای معتبرسازی محاسبات داکینگ از روش اختلاف مجذور مربع میانگین^۳ استفاده شده است. در این روش اختلاف مجذور مربع میانگین مختصات اتم‌های مربوط به کانفورماسیون لیگاند اصلی استخراج شده از ساختار کریستالوگرافی و بالاترین کانفورماسیون محاسبه شده این لیگاند توسط محاسبات داکینگ مولکولی به عنوان معیاری از صحت بهترین کانفورمر پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار در نظر گرفته شد. خطای جذر میانگین مربعات یا انحراف جذر میانگین مربعات، تفاوت میان مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل یا برآوردگر آماری و مقدار واقعی است. RMSD ابزار خوبی برای مقایسه خطاهای پیش‌بینی توسط یک مجموعه داده است و برای مقایسه چند مجموعه داده کاربرد ندارد. آنالیز خوشه‌بندی^۴ کانفورماسیون‌های نتایج داکینگ بر این اساس صورت پذیرفت که کانفورماسیون‌های مشابه (قرار گرفته در یک خوشه) حداکثر آستانه اختلاف مجذور مربع میانگین (RMSD) معادل ۲ آنگستروم داشته باشند.

یافته‌ها

ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات

پس از محاسبه درصد مهارکنندگی ترکیبات بر روی ۳ رده سرطانی مذکور در غلظت‌های مختلف، فعالیت ضد سرطانی این ترکیبات با استفاده از نرم‌افزار Curve Expert نسخه ۴/۱ به صورت IC_{50} محاسبه و در جدول شماره ۱ گزارش شد.

برای تعیین IC_{50} ، ابتدا نمودار درصد مهارکنندگی بر حسب غلظت (۶ غلظت مختلف، غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) توسط نرم‌افزار Curve Expert نسخه ۱/۴ رسم شد. بدین وسیله غلظتی از ترکیب که در آن فقط ۵۰ درصد سلول‌ها زنده می‌مانند (Inhibitory Concentration 50: IC_{50})، به دست آمد.

داکینگ مولکولی

مطالعات داکینگ مولکولی این ترکیبات توسط نرم‌افزار Autodock نسخه ۴/۲ انجام شد. به منظور انجام این مطالعات داکینگ، بهترین ساختار کریستالوگرافی اشعه ایکس با کد 1LU5 از سایت www.rscb.org استخراج شد. سپس تمام تصحیح‌های اسید آمینه‌ای یا بازهای DNA با استفاده از نرم‌افزار MOE انجام شد. همچنین لیگاند همراه و مولکول‌های آب حذف شد. به دنبال آن، اتم‌های هیدروژن غیرقطبی در اتم کربن مربوطه ادغام شده و پارامترهای حلال پوشی ماکرومولکول و بارالکتریکی کلن با استفاده از نرم‌افزار Autodock نسخه ۴/۲ محاسبه شد و در نهایت فایل ماکرومولکول با فرمت pdbqt ذخیره شد. همچنین ساختار دوبعدی لیگاندها با استفاده از نرم‌افزار Chem-BioDraw 2D ترسیم شد و سپس به محیط نرم‌افزار گرافیکی Hyperchem نسخه ۸ منتقل شد. در این حالت بهینه‌سازی کانفورماسیون لیگاند از نظر انرژی با روش مولکولار مکانیک (MM^+) و نیمه تجربی (AM1 یا PM3) انجام گرفت. این فایل به صورت pdbqt ذخیره شد. پس از بهینه‌سازی انرژی لیگاند، بارالکتریکی گسستگی (بارهای الکتریکی اتم که به صورت تجربی محاسبه می‌شود) و تعداد درجات آزادی زوایای پیچشی لیگاند با استفاده از نرم‌افزار AutoDock محاسبه شد. در نهایت فایل لیگاند به صورت pdbqt ذخیره شد.

پس از آماده‌سازی فایل‌های ورودی مورد نیاز داکینگ (ماکرومولکول، لیگاند و نقشه اتصال)، مطالعات داکینگ به منظور مدل‌سازی برهم‌کنش‌های لیگاند-DNA، با استفاده از الگوریتمی تحت عنوان ژنتیک لامارکین انجام شد [۲۷].

سپس بر اساس حجم مولکولی لیگاندهای طراحی شده، شبکه‌ای با ابعاد $116 \times 68 \times 64$ آنگستروم در راستای محورهای

3. Root Mean Square Deviation
4. Cluster analysis

جدول ۱. نتایج ارزیابی زیستی به صورت IC_{50}

Compound	R	میانگین $\pm$ انحراف معیار (IC_{50})		
		MCF-7	A549	SKOV3
C_1	-COOH	$1/7 \pm 0/9$	$6/2 \pm 2/3$	$9/5 \pm 2/9$
C_2		$44/3 \pm 4/1$	$59/0 \pm 5/5$	$88/4 \pm 3/8$
C_3	-COOH	$65/5 \pm 2/4$	$76/1 \pm 5/9$	$71/8 \pm 4/5$
C_4		$87/6 \pm 5/1$	>100	>100
C_5	-COOH	$79/7 \pm 4/1$	$83/9 \pm 4/8$	$89/6 \pm 5/3$
C_6		$95/5 \pm 4/5$	>100	>100
DOX	-	$0/8 \pm 0/8$	$1/2 \pm 0/3$	$1/9 \pm 0/5$

جندی شاپور

مقدار IC_{50} آن نسبت به DOX بیشتر است، ولی آنالیز آماری به روش آنوای یک طرفه نشان داد که این تفاوت معنادار نبود. به دنبال آن، ترکیب‌های C_2 و C_3 با IC_{50} معادل به ترتیب ۴۴/۳ و ۶۵/۵ میکرومولار اثرات سمیت سلولی خوبی از خود نشان دادند. به طور کلی ترتیب اثرات سمیت سلولی ترکیبات بر روی این رده به شرح فرمول شماره ۳ هستند.

۳.

$$MCF-7: DOX > C_1 > C_3 > C_5 > C_3 > C_4, C_6$$

علاوه بر این، در ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک بر روی رده سرطانی ریه (A549)، در ترکیب C_1 بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک مشاهده شد. این ترکیب دارای $IC_{50} = 6.2 \mu M$ است. بعد از ترکیب C_1 ، ترکیب‌های C_2 و C_3 با IC_{50} به ترتیب ۵۹/۰ و ۷۶/۱ میکرومولار اثرات سمیت سلولی کمتری از خود نشان دادند. ترتیب قدرت ترکیبات بر روی این رده به شرح

داکینگ مولکولی

برهم کنش ترکیبات با DNA (1LU5) توسط داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج انرژی داکینگ در جدول شماره ۲ آورده شده است. برای برهم کنش مدل‌های پیش‌بینی شده توسط داکینگ مولکولی با جایگاه فعال DNA، از نقشه دوبعدی و سه‌بعدی اتصال ترکیبات به DNA استفاده شد که در این میان، نقشه اتصال ترکیب C_1 با بالاترین انرژی داکینگ مولکولی در تصویر شماره ۲ آورده شده است.

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول شماره ۱، بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده سرطانی پستان (MCF-7)، مشاهده شد که در بین این ترکیبات، ترکیب C_1 با $IC_{50} = 1.7 \mu M$ بالاترین اثرات سمیت سلولی را از خود نشان داد. هرچند

جدول ۲. نتایج انرژی داکینگ مولکولی

لیگاند	انرژی اتصال داکینگ (کیلوکالری بر مول)
C1	گيرنده (1LU5) -۷/۷۲
C2	-۶/۵۷
C3	-۶/۸۰
C4	-۶/۱۳
C5	-۶/۵۸
C6	-۶/۲۶

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

فرمول شماره ۴ است.

۵.

SKOV3: DOX > C₁ > C₃ > C₂ > C₅ > C₄, C₆

۴.

A549: DOX > C₁ > C₂ > C₃ > C₅ > C₄, C₆

به طور کلی ترکیب C₁ نسبت به بقیه ترکیبات بر روی هر ۳ رده سرطانی مورد بررسی، از نظر فعالیت سیتوتوکسیک اثرات بهتری از خود نشان داده است و به عنوان قوی ترین ترکیب مجموعه عمل کرده است.

همچنین در ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک بر روی رده سرطانی تخمدان (SKOV3)، بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک مشاهده شده در بین این ترکیبات، مربوط به ترکیب C₁ است. این ترکیب دارای IC₅₀=9.5 μM است. ترکیب C₃ با IC₅₀ معادل ۷۱/۸ میکرومولار فعالیت سیتوتوکسیک ضعیف تری نسبت به ترکیب C₁ بر روی این رده از خود نشان داد.

ترتیب قدرت ترکیبات بر روی این رده به شرح ذیل فرمول شماره ۵ است.

علاوه بر این، مقایسه نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعات پیشین [۲۳، ۲۸] نشان می دهد که ترکیب C₁ نسبت به ترکیبات مورد بررسی در آن مطالعات اثرات بهتری از خود نشان داده است. در یکی از این مطالعات که یکسری از ترکیبات نفتالیمیدی کونژوگه با لوسین سنتز شده بود و فعالیت ضد سرطانی آن ها در برابر چندین رده سلولی از جمله MCF-7 و A549 مورد بررسی قرار گرفته بود [۲۳]، بهترین ترکیب این

مجله علمی پزشکی
جندی شاپورتصویر ۲. نمایش دوبعدی و سه بعدی نحوه برهم کنش ترکیب C₁ با جایگاه فعال 1LU5

وجود اتصال به جایگاه فعال، برهم کنش های کلیدی با بازها و یا اسیدهای آمینه ای که در مدل های فارماکوفوری ارائه شده اند را نداشته باشد.

در همین راستا و برای ارزیابی نحوه برهم کنش مدل های پیش بینی شده توسط داکینگ با جایگاه فعال DNA، از نقشه دوبعدی و سه بعدی اتصال ترکیبات به DNA استفاده شد. این نقشه ها با استفاده از نرم افزارهای MOE و AutoDock Tools (۲۰۱۴) ایجاد شده اند.

همان طور که در **تصویر شماره ۲** نشان داده شده است، ترکیب C_1 در شیار کوچک^۵ DNA، قرار گرفته و از طریق باز سیتوزین شماره ۳ با کربونیل حلقه فتالیمیدی پیوند هیدروژنی برقرار می کند. همچنین از طریق OH گروه کربوکسیل بخش اسید آمینه ایزولوسین با باز گوانین شماره ۱۲ پیوند هیدروژنی ایجاد می کند.

اعتبارسنجی داکینگ مولکولی

مطالعات داکینگ مولکولی در صورتی موفقیت آمیز خواهد بود که روش های به کاررفته در آن اعتبارسنجی شده باشند. هدف از اعتبارسنجی فرایند داکینگ این است که منابع نرم افزاری و روش انتخاب شده تا چه میزان توانایی تمییز دادن بین ترکیبات فعال و غیر فعال را دارند.

روش های مختلفی برای اعتبارسنجی فرایند داکینگ و تابع امتیازدهی آن وجود دارد [۲]. یک روش متداول، بررسی کانفورماسیون پیش بینی شده در فرایند داکینگ است. در این روش یک ترکیب با ساختار و جهت گیری مشخص در جایگاه فعال آنزیم (معمولاً ساختار کریستالوگرافی دارای لیگاند)، با استفاده از نرم افزار داکینگ دوباره در جایگاه فعال آنزیم داک می شود. نرم افزاری که کانفورمر پیش بینی شده توسط آن نسبت به ساختار کریستالوگرافی دارای RMSD کمتری باشد (معمولاً بین ۱/۵ تا ۲ آنگستروم بسته به اندازه لیگاند) فرایند داکینگ را با موفقیت بیشتری انجام داده است [۲۹]. بدین منظور داکینگ لیگاند کوکریستاله با DNA طبق پارامترهای اعمال شده بر ترکیبات منتخب، نیز انجام شد و این ترکیب در ساختار DNA در جایگاهی بسیار یکسان با حالت کوکریستاله خود قرار گرفت و RMSD به دست آمده ۱/۵۶ آنگستروم (کمتر از ۲ آنگستروم) بوده است.

نتیجه گیری

در این مطالعه تجربی ۶ ترکیب فتالیمیدی و نفتالیمیدی با اثرات بالقوه ضد سرطانی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آزمایشگاهی تأیید کننده این مطلب است که این ترکیبات اثرات بالقوه ضد

مطالعه، 7b، بر روی این دو رده، IC_{50} به ترتیب معادل ۱۵/۰۲ و ۲۵/۰۸ میکرومولار داشته که این مقادیر نسبت به مقادیر حاصل از ترکیب C_1 بیشتر است.

بررسی رابطه ساختار فعالیت ترکیبات

بررسی های اولیه نشان می دهد که ترکیبات نفتالیمید (C_1) اثرات قوی تری نسبت به ترکیبات فتالیمید (C_3 - C_6) نشان می دهند. همچنین به طور کلی، این ترکیبات بر روی رده سلولی MCF-7 اثرات بهتری نسبت به دو رده دیگر (A549, SKOV3) داشتند. قوی ترین ترکیب در بین هر دو دسته مشتقات، ترکیب C_1 است که به دسته ترکیبات نفتالیمیدی تعلق دارد که این اثرات بهتر را می توان به داشتن بخش اسید آمینه ای ایزولوسین نسبت داد، چرا که این بخش با افزایش امکان جذب در سلول های سرطانی، منجر به افزایش اثرات ضد سرطانی شده است [۲۳]. علاوه بر این، مقایسه مشتقات فتالیمید و نفتالیمید نشان می دهد که ترکیبات C_5 ، C_3 و C_1 دارای بخش کربوکسیل، اثرات بهتری نسبت به سه ترکیب C_4 ، C_2 و C_6 که دارای بخش ۵-آمیدوایزو فتالیک اسید است، ایجاد می کند. این نتایج می تواند به این دلیل باشد که ترکیبات C_5 ، C_3 و C_1 دارای فقط یک گروه کربوکسیل هستند. در حالی که ترکیبات C_4 ، C_2 و C_6 دارای دو گروه کربوکسیل هستند. بخش کربوکسیل به دلیل اینکه می تواند یونیده شود میزان جذب ترکیب را کاهش می دهد.

داکینگ مولکولی

همان طور که در **جدول شماره ۲** مشاهده می شود، ترکیب C_1 دارای بهترین (منفی ترین) انرژی اتصال به DNA است. این ترکیب نسبت به سایر ترکیبات در اتصال به DNA عملکرد بهتری داشته است. ترتیب انرژی داکینگ ترکیبات بر روی ساختار DNA به شرح **فرمول شماره ۶** است.

۶

$$DNA (1LU5): C_1 > C_3 > C_5 > C_2 > C_6 > C_4$$

بررسی الگوهای برهم کنش ترکیبات DNA

بعد از مشخص شدن جایگاه هر ترکیب در رتبه بندی داکینگ، فاکتور مهمی که مورد بررسی قرار گرفت نحوه برهم کنش ترکیبات با بازهای کلیدی جایگاه فعال DNA است، زیرا در حین بررسی نتایج داکینگ ترکیبات با رسپتور، تنها نمی توان با تکیه بر داده های کمی داکینگ غربالگری را انجام داد، بلکه بایستی نحوه برهم کنش برترین کانفورمر پیش بینی شده توسط داکینگ با جایگاه فعال رسپتور مورد ارزیابی قرار گیرد. چه بسا لیگاندی انرژی آزاد پیوند شدن بزرگ (منفی) داشته باشد، اما به موقعیتی به غیر از جایگاه فعال DNA یا آنزیم متصل شود و یا حتی با

سرطانی از خود نشان می‌دهند که در میان این ترکیبات، ترکیب C_1 با پایین‌ترین مقادیر C_{50} ، توانایی این را دارد که در مسیر توسعه ترکیبات ضد سرطان به عنوان ترکیب راهبر انتخاب شده و مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز قرار گرفته است (کد: 1396.470IR. AJUMS.REC). این مطالعه در حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد B-9653 به تصویب رسیده است.

حامی مالی

مقاله حاضر بخشی از رساله‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی عمومی نویسنده اول در مرکز تحقیقات سم شناسی، مؤسسه تحقیقات علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز است. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز حامی مالی این پژوهش بوده است.

مشارکت نویسندگان

ویراستاری، نهایی‌سازی نوشته، تحقیق و بررسی: ایوب مجدمی؛ انجام تست‌های بیولوژیکی: نگین آهنج؛ نگارش پیش‌نویس: مهدی تقوی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که بودجه لازم برای این کار را فراهم کرد و همچنین مرکز سم‌شناسی را که در اختیار محققان گذاشت، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- [1] Shankaraiah N, Kumar NP, Tokala R, Gayatri BS, Talla V, Santos LS. Synthesis of new 1,2,3-Triazolo-naphthalimide/phthalimide conjugates via 'click' reaction: DNA intercalation and cytotoxic studies. *J Braz Chem Soc.* 2019; 30(3):454-61. [DOI:10.21577/0103-5053.20180111]
- [2] Taheri B, Taghavi M, Zarei M, Chamkouri N, Mojaddami A. Imidazole and carbazole derivatives as potential anticancer agents: Molecular docking studies and cytotoxic activity evaluation. *Bull Chem Soc Ethiop.* 2020; 34(2):377-84. [DOI:10.4314/bcse.v34i2.14]
- [3] Lima LM, Castro P, Machado AL, Fraga CAM, Lugnier C, de Moraes VLG, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10(9):3067-73. [DOI:10.1016/S0968-0896(02)00152-9]
- [4] Singh G, Saroa A, Girdhar Sh, Rani S, Sahoo S, Choquesillo-Lazarte D. Synthesis, characterization, electronic absorption and antimicrobial studies of N-(silatranylpropyl)phthalimide derived from phthalic anhydride. *Inorganica Chim Acta.* 2015; 427:232-9. [DOI:10.1016/j.ica.2015.01.011]
- [5] Gong HH, Baathulaa K, Lv JS, Cai GX, Zhou CH. Synthesis and biological evaluation of Schiff base-linked imidazolyl naphthalimides as novel potential anti-MRSA agents. *MedChemComm.* 2016; 7(5):924-31. [DOI:10.1039/C5MD00574D]
- [6] González MA, Clark J, Connelly M, Rivas F. Antimalarial activity of abietane ferruginol analogues possessing a phthalimide group. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(22):5234-7. [DOI:10.1016/j.bmcl.2014.09.061] [PMID]
- [7] Yang YJ, Zhao JH, Pan XD, Zhang PC. Synthesis and antiviral activity of phthiobuzone analogues. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58(2):208-11. [DOI:10.1248/cpb.58.208] [PMID]
- [8] Shinji Ch, Nakamura T, Maeda S, Yoshida M, Hashimoto Y, Miyachi H. Design and synthesis of phthalimide-type histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(20):4427-31. [DOI:10.1016/j.bmcl.2005.07.048] [PMID]
- [9] Si W, Zhang T, Zhang L, Mei X, Dong M, Zhang K, et al. Design, synthesis and bioactivity of novel phthalimide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26(9):2380-2. [DOI:10.1016/j.bmcl.2015.07.052] [PMID]
- [10] Arif R, Nayab PS, Ansari IA, Shahid M, Irfan M, Alam Sh, et al. Synthesis, molecular docking and DNA binding studies of phthalimide-based copper(II) complex: In vitro antibacterial, hemolytic and antioxidant assessment. *J Mol Struct.* 2018; 1160:142-53. [DOI:10.1016/j.molstruc.2018.02.008]
- [11] Kok SHL, Gambari R, Chui CH, Yuen MCW, Lin E, Wong RSM, et al. Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(7):3626-31. [DOI:10.1016/j.bmc.2008.02.005] [PMID]
- [12] Chan SH, Lam KH, Chui CH, Gambari R, Yuen MCW, Wong RSM, et al. The preparation and in vitro antiproliferative activity of phthalimide based ketones on MDAMB-231 and SKHep-1 human carcinoma cell lines. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(6):2736-40. [DOI:10.1016/j.ejmech.2008.10.024] [PMID]
- [13] Kamal A, Bolla NR, Srikanth PS, Srivastava AK. Naphthalimide derivatives with therapeutic characteristics: A patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2013; 23(3):299-317. [DOI:10.1517/13543776.2013.746313] [PMID]
- [14] Rahmani-Nezhad S, Safavi M, Pordeli M, Kabudanian Ardostani S, Khosravani L, Pourshojaei Y, et al. Synthesis, in vitro cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. *Eur J Med Chem.* 2014; 86:562-9. [DOI:10.1016/j.ejmech.2014.09.017] [PMID]
- [15] Pourshojaei Y, Abiri A, Eskandari R, Dourandish F, Eskandari Kh, Asadipour A. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of novel fused six-membered O-containing heterocycles as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Comput Biol Chem.* 2019; 80:249-58. [DOI:10.1016/j.compbiolchem.2019.04.004] [PMID]
- [16] Mirzaie V, Ansari M, Nematollahi-Mahani SN, Moballegh Nasery M, Karimi B, Eslaminejad T, et al. Nano-graphene oxide-supported APTES-Spermine, as gene delivery system, for transfection of pEGFP-p53 into breast cancer cell lines. *Drug Des Devel Ther.* 2020; 14:3087-97. [DOI:10.2147/DDDT.S251005] [PMID] [PMCID]
- [17] Braña MF, Ramos A. Naphthalimides as anticancer agents: Synthesis and biological activity. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2001; 1(3):237-55. [DOI:10.2174/1568011013354624] [PMID]
- [18] Braña MF, Cacho M, Gradillas A, de Pascual-Teresa B, Ramos A. Intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* 2001; 7(17):1745-80. [DOI:10.2174/1381612013397113] [PMID]
- [19] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3):188-200. [DOI:10.1038/nrc749] [PMID]
- [20] Chen Zh, Liang X, Zhang H, Xie H, Liu J, Xu Y, et al. A new class of naphthalimide-based antitumor agents that inhibit topoisomerase II and induce lysosomal membrane permeabilization and apoptosis. *J Med Chem.* 2010; 53(6):2589-600. [DOI:10.1021/jm100025u] [PMID]
- [21] Filosa R, Peduto A, Di Micco S, de Caprariis P, Festa M, Petrella A, et al. Molecular modelling studies, synthesis and biological activity of a series of novel bisnaphthalimides and their development as new DNA topoisomerase II inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(1):13-24. [DOI:10.1016/j.bmc.2008.11.024] [PMID]
- [22] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11:127-52. [DOI:10.1016/S1387-2656(05)11004-7]
- [23] Wu A, Xu Y, Qian X. Novel naphthalimide-amino acid conjugates with flexible leucine moiety as side chain: Design, synthesis and potential antitumor activity. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(2):592-9. [DOI:10.1016/j.bmc.2008.11.080] [PMID]
- [24] Mallakpour Sh, Taghavi M. A facile, microwave-assisted synthesis of novel optically active polyamides derived from 5-(3-methyl-2-phthalimidylpentanoylamino)isophthalic acid and different diisocyanates. *Eur Polym J.* 2008; 44(1):87-97. [DOI:10.1016/j.eurpolymj.2007.10.027]

- [25] Mallakpour Sh, Taghavi M. Efficient and rapid synthesis of optically active polyamides in the presence of tetrabutylammonium bromide as ionic liquids under microwave irradiation. *J Appl Polym Sci*. 2008; 109(6):3603-12. [DOI:10.1002/app.28263]
- [26] Mallakpour Sh, Taghavi M. Molten tetrabutylammonium bromide as eco-friendly media for the synthesis of optically active and thermal stable polyamides under microwave irradiation. *Polym J*. 2008; 40(11):1049-59. [DOI:10.1295/polymj.PJ2008056]
- [27] Khaledi M, Ziyadeh Q, Atiq H, Chamkouri N, Mojaddami A. Molecular docking and druggability studies of terpenoid-derived metabolites from marine sponges as IL-17A inhibitors. *Eurasian Chem Commun*. 2019; 1(5):419-32. [DOI:10.33945/SAMI/ECC.2019.5.2]
- [28] de Oliveira Cardoso MV, Moreira DRM, Oliveira Filho GB, Cavalcanti SMT, Coelho LCD, Espíndola JWP, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. *Eur J Med Chem*. 2015; 96:491-503. [DOI:10.1016/j.ejmech.2015.04.041] [PMID]
- [29] Fereidoon nezhad M, Tabaei SMH, Sakhteman AH, Seradj H, Faghhi Z, Faghhi Z, et al. Design, synthesis, molecular docking, biological evaluations and QSAR studies of novel dichloroacetate analogues as anticancer agent. *J Mol Struct*. 2020; 1221:128689. [DOI:10.1016/j.molstruc.2020.128689]