

Synthesis, Molecular Docking Study and Evaluation of Cytotoxic Activity of Two Homoisoflavonoids Containing Morpholinoethoxy Substitution

Touba Eslaminejad¹, Khalil Eskandari², Fatemeh Abedinezhad³, Bagher Amirheidari⁴, Ali Asadipour⁵, Yaghoub Pourshojaei⁶

1. Assistant Professor, Pharmaceutics Research Centre, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5920-1542

2. Researcher, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2919-7324

3. Pharm. D. Herbal and Traditional Medicines Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6535-0835

4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1086-4286

5. Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1449-2195

6. Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98 34 31325001, E-mail: pourshojaei@yahoo.com and y.pourshoja@kmu.ac.ir ORCID ID: 0000-0002-6994-7361.

ABSTRACT

Background and Aim: Chemotherapy is one of the most common methods available for the treatment of cancer. Resistance to anticancer drugs can result in failures in chemotherapy of cancers. Therefore, investigation is necessary for the discovery of new drugs. Homoisoflavonoids are well-known natural products that possess a wide range of pharmacological activities. Hence, synthesis and assessment of cytotoxicity of homoisoflavonoids containing morpholinoethoxy moiety and their molecular docking simulation were taken into consideration.

Materials and Methods: Two 7-morpholinoethoxyhomoisoflavonoids synthesized via three steps including SN₂ reaction of 7-hydroxychromanone with morpholino ethyl chloride hydrochloride in the basic media under reflux condition to produce intermediate 3. The second step included aldol condensation of the intermediate with suitable aldehydes in the presence of gaseous HCl in ethanol, and finally neutralization with NaOH 5%. The structures of the products were confirmed using IR, ¹³CNMR, and ¹HNMR techniques. Cytotoxic effects of final products on HT-29 and 3T3 cell lines were assessed. To evaluate the binding mode of compounds with tubulin protein, docking simulation was performed by using MOE.

Results: Two morpholinoethoxy homoisoflavonoids were prepared with moderate to good production yield. Cytotoxic evaluation of these compounds showed satisfactory results. The results of molecular docking simulation showed an acceptable binding energy of the interaction between the ligands with the tubulin protein binding site: (E)-7-(2-morpholinoethoxy)-3-(3,4,5-trimethoxybenzylidene) chroman-4-one= -7.3727 Kcal/mol and (E)-3-(4-methoxybenzylidene)-7-(2-morpholinoethoxy) chroman-4-one released -7.6838 Kcal/mol per mole of energy.

Conclusion: The results showed that compound (E)-3-(4-methoxybenzylidene)-7-(2-morpholinoethoxy) chroman-4-one has higher cytotoxicity than (E)-7-(2-morpholinoethoxy)-3-(3,4,5-trimethoxybenzylidene) chroman-4-one against HT-29 and 3T3 cell lines. The *in-silico* results confirmed the results obtained from *in vitro* experiments and showed three interactions between ligand (E)-3-(4-methoxybenzylidene)-7-(2-morpholinoethoxy)chroman-4-one and αThr179, αThr145, and αTyr224 amino acids in tubulin active site.

Key word: Molecular docking, cytotoxic activity, *Homoisoflavonoids*

Received: Mar 19, 2021

Accepted: Mar 1, 2022

How to cite the article: Touba Eslaminejad, Khalil Eskandari, Fatemeh Abedinezhad, Bagher Amirheidari, Ali Asadipour, Yaghoub Pourshojaei. Synthesis, Molecular Docking Study and Evaluation of Cytotoxic Activity of Two Homoisoflavonoids Containing Morpholinoethoxy Substitution. SJKU 2022;27(3):23-35.

ستز، مطالعه داکینگ مولکولی و بررسی اثر سیتو توکسیک دو هوموایزو فلاؤنؤید دارای استخلاف
مورفولینو اتوکسی

^۶ طوبی اسلامی نژاد، خلیل اسکندری، فاطمه عابدی نژاد، باقر امیر حیدری، علی اسدی پور، یعقوب پور شجاعی

۱. استادیار، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارجید: ۰۵۹۲۰-۱۵۴۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰
 ۲. پژوهشگر، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارجید: ۷۳۲۴-۲۹۱۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰
 ۳. دکتر داروسازی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران کد ارجید: ۰۸۳۵-۶۵۳۵-۰۰۰۱-۰۰۰۰
 ۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارجید: ۴۲۸۶-۱۰۸۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰
 ۵. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارجید: ۲۱۹۵-۱۴۴۹-۰۲-۰۰۰۰
 ۶. استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۳۴۳۲۲۳۱۵۰۰۱، پست الکترونیک: pourshojaei@yahoo.com

چندھ

زمینه و هدف: شیمی درمانی یکی از رایج ترین راههای قابل دسترس برای درمان سرطان است. مقاومت دارویی یکی از موانع موفقیت در شیمی درمانی سرطان است؛ بنابراین تحقیق در این زمینه برای کشف داروهای جدید ضروری است. هموایزوپلاونوئیدها ترکیبات طبیعی شناخته‌ای هستند که دارای فعالیتهای فارماکولوژیک وسیعی هستند؛ بنابراین سنتز و ارزیابی سمیت سلولی هموایزوپلاونوئیدهای حاوی مورفولیناتوکسی همراه با شیمی‌سازی داکینگ مولکولی مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: دو ۷-مورفولیناتوکسی‌هوموایزوفالونوئید در طی سه مرحله سنتز شدند. مرحله اول شامل یک واکنش SN_2 بود که ۷-هیدروکسی کرمانون با مورفولیناتیل کلریدهیدروکلرید در محیط بازی و تحت شرایط رفلaksن واکنش داد تا حد واسط ۳ به دست آید، در مرحله دوم تراکم آلدولی حد واسط اخیر با آلدهیدهای مناسب در مجاورت HCl گازی در حلال اتانول صورت گرفت و درنهایت خشی‌سازی با سود ۵ درصد انجام شد. ساختار محصولات با روش‌های $^1\text{H}\text{NMR}$, $^{13}\text{C}\text{NMR}$ و IR تائید و سپس سمیت سلولی ترکیبات بر روی رده‌های سلولی 29-HT و 3T3 ارزیابی شد. برای بررسی طرز اتصال ترکیبات با پروتئین توبولین، شبیه سازی داکینگ با استفاده از MOE انجام شد.

یافته‌ها: دو مشتق مورفولینوات کسی همواری و فلاونوئید با راندمان تولید متوسط تا خوب تهیه شد. ارزیابی سمیت سلولی این ترکیبات، فعالیت رضایت‌بخشی را حاصل کرد. نتایج شیوه سازی داکینگ مولکولی، انژوی اتصال قابل قبولی از واکنش بین لیگاندها با جایگاه اتصال پروتئین توبولین را نشان داد: (E)-۷-(مورفولینات کسی)-۳-(متوكسی بنزیلیدن) کرومأن-۴-اون برابر با ۷/۶۸۳۸ و (E)-۷-نم، فه لینه اته کسی)-۳-(۴ و ۵-تی، متنه کسی بنزیلیدن) کرومأن-۴-اون کلله کالا، به مول ان ۲، آزاد کردند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که ترکیب (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۴-متوکسیبنزیلیدن)کرومانت-۴-اون سمیت سلوالی بیشتری نسبت به ترکیب (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۳ و ۵-تری متوكسیبنزیلیدن)کرومانت-۴-اون در مقابل رده های سلوالی ۲۹-HT و ۳T3 دارد. نتایج مطالعات کامپیوتربی، نتایج به دست آمده از آزمایش های برون تنی را تائید کرد و سه برهمکنش بین لیگاند (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۴-متوکسیبنزیلیدن)کرومانت-۴-اون و اسیدهای آمینه α Thr^{۱۷۹}, α Thr^{۱۴۵} و α Tyr^{۲۲۴} در حالت فعال ته بولین نشان داد.

واژه‌های کلیدی: داکینگ مولکولی، سیتو توکسیک، هو مو اینز و فلاونوئید

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹ اصلاحه نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۰

مقدمه

سرطان به مجموعه‌ای از بیماری‌ها گفته می‌شود که با رشد و تقسیم کنترل نشده و در نهایت پخش سلول‌های غیرطبیعی (متاستاز) در بدن بیمار مشخص می‌شود. اگر متاستاز کنترل نشود، مرگ اتفاق خواهد افتاد. سرطان دومین علت مرگ و میر در جهان و سومین عامل مرگ و میر در ایران است. روش‌های زیادی برای درمان سرطان وجود دارد ولی در بیشتر روش‌های درمانی سرطان، یک داروی شیمیابی وجود دارد. با توجه به گزارش‌های متعدد در مورد عوامل ضد سرطان سنتزی تا به امروز هیچ دارویی با ۱۰۰٪ کارایی تولید نشده است؛ بنابراین، در حال حاضر درخواست‌های قابل توجهی برای کشف دارو و ترکیبات ضد سرطان مؤثر، بدون عوارض مرتبط با شیمی درمانی در درمان سرطان مانند سمیت و مقاومت دارویی وجود دارد (۴-۱) و تحقیقات بسیار زیادی در این زمینه صورت پذیرفته است (۷-۵).

هوموایزوفلاؤنئید‌ها (homoisoflavonoid) نوعی از ترکیبات طبیعی جدا شده از گیاهان متعددی هستند که ساختار شیمیابی آن‌ها شامل دو حلقه آروماتیک (فنیل) و یک حلقه هتروسیکل (heterocycle) غیر آروماتیک (dihydropyran-4-one) است. هوموایزوفلاؤنئیدها را می‌توان به پنج دسته: (۱) ۳-بنزیل-۴-کرومونون، (۲) ۳-هیدروکسی-۳-بنزیل-۴-کرومونون، (۳) ۳-بنزیل-کروم-۲-ان-۴-اون‌ها، (۴) سیلاسیلین‌ها و (۵) ۳-بنزیلیدن-۴-کرومانون‌ها تقسیم کرد (۸، ۹).

تا به حال مطالعات زیادی بر روی سنتز و بررسی اثر هوموایزوفلاؤنئیدها صورت پذیرفته است. این نوع از ترکیبات و ترکیبات مرتبط، فعالیت‌های زیستی فراوانی شامل: فعالیت ضد قارچی (۸)، ضدالتهابی (۹)، ضد ویروسی (۱۰)، مهار استیل کولین استرازی (۱۱-۱۳) و سمیت سلولی (۱۴) از خود نشان داده‌اند. در میان محصولات طبیعی حاوی ساختار هوموایزوفلاؤنئید، بوندوسلین (Bonducellin) به عنوان

مهار کننده پمپ خارج کننده مقاومت چند دارویی (Multidrug Resistance Efflux Pump) عمل می‌کند (۱۵). همچنین ایزوبوندوسلین و ۸-متوكسی بوندوسلین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان داده‌اند (۱۶). علاوه بر این، ساپانون A (Sappanone A) یکی دیگر از ترکیبات هموایزوفلاؤنئید است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد (۱۷).

با توجه به اینکه در بسیاری از ترکیب‌های دارای اثر سمیت سلولی گروه فنیل حاوی استخلاف متوكسی (۱۸) و زنجیره آلکوکسی آمین (۱۹) وجود دارد و در ادامه فعالیت‌های گروه تحقیقاتی ما بر روی سنتز ترکیبات فعال زیستی با به طور بالقوه زیستی (۲۰-۲۳)، در این تحقیق دو مشتق هموایزوفلاؤنئید (از دسته ۵ هموایزوفلاؤنئیدها، ۳-بنزیلیدن-۴-کرومانون‌ها) دارای گروه‌های متوكسی و زنجیره آلکوکسی آمین سنتز شد و اثرات سیتوکسیک آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال مورد ارزیابی قرار گرفت. رابطه ساختار و فعالیت یک دسته از مهار کننده‌های توبولین، نشان می‌دهد که اتصال حلقه‌های آروماتیک حاوی گروه متوكسی که از طریق یک پیونددهنده (Spacer)، (حلقه، پیوند دوگانه، آمید و ایمین) که به حلقه‌ی آروماتیک یا هتروسیکل متصل شده‌اند فعالیت مهار کننده‌گی توبولین دارند؛ به عبارت دیگر یکی از مکانیسم‌های ضد سرطانی ترکیب‌های دارای استخلاف متوكسی فنیل، مهار پلیمریزاسیون توبولین است (۲۴، ۲۵)، لذا داکتینگ مولکولی ترکیبات سنتز شده در این پژوهش، (حلقه فنیل حاوی گروه متوكسی که از طریق پیوند دوگانه به حلقة کرومانون متصل شده) در جایگاه اتصال پروتئین توبولین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها**سنتز ترکیبات**

نمای کلی سنتز ترکیب‌های مورد نظر در تصویر ۱ آورده شده است.

تهیه -۷-(مورفولینواتوکسی) کرومأن -۴-اون ۳: ابتدا در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری مجهز به مگنت، ۵ میلی مول ۷-هیدروکسی کرومأن -۴-اون ۲ و ۵ میلی لیتر DMF و سپس ۰/۰۳ مول در صد K_2CO_3 پودر شده به محلول واکنش اضافه شد و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد هم زده شود. در مرحله بعد ۵ میلی مول مورفولیناتیل کلرید هیدروکلرید به محلوت واکنش اضافه شد و به مدت ۴ ساعت رفلaks شد. پیشرفت واکنش تا مصرف شدن کامل مواد اولیه با استفاده از TLC پیگیری شد. پس از پایان واکنش محلوت واکنش را سرد و به آن ۵۰ میلی لیتر آب اضافه کرده و سپس محصول واکنش با اتیل استات (۳ بار و هر بار ۵۰ میلی لیتر) استخراج گردید و فاز آلی با سولفات سدیم، خشک شد و پس از پراندن حلال با فشار منفی، حد وسط ۳ خواسته شد.

به صورت خالص

به دست آمد (۱۱, ۲۶).

مواد اولیه شیمیایی به کار رفته در این پژوهش همه از کارخانه مرک یا آلدربیج خریداری و بدون خالص سازی استفاده شده‌اند. حالاتی به کار رفته در این تحقیق از شرکت مرک تهیه شده‌اند به جز آب مقطر که از شرکت آب-بان ایران خریداری شده است. دی‌متیل فرم آمید (DMF) با شماره بث CAS Number (CAS Number) (۶۸۱۲۲) برابر با استات (۱۴۱۷۸۶)، اتانول (۶۴۱۷۵)، ایزوپروپیل الکل (۶۷۶۳۰). پیشرفت واکنش‌ها به وسیله کروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC) و لامپ ماوراء بنفش (UV) کنترل شد. نقطه ذوب مواد به وسیله دستگاه نقطه ذوب Electrothermal IA9100 استفاده از دستگاه Bruker، طیف رزونانس مغناطیسی (NMR) با دستگاه اسپکترومتر Bruker (MHz 400) تهیه گردید و جابجایی شیمیایی (δ) بر حسب ppm در مقایسه با شاهد داخلی تترامتیل‌سیلان (TMS) گزارش شد.

تصویر ۱: طرح سنتز مشتقات تهیه شده در این تحقیق و شرایط سنتز ترکیبات ۴a و ۴b

مورفولیناتوکسی (E)-۷-(مورفولیناتوکسی)-۴،۳-تری متوكسی بنزآلدهید افزوده و سپس تحت هم‌زدن، به مدت ۵ دقیقه گاز هیدروژن کلرید در آن دمیده شد تا محصول مورد

تهیه (E)-۷-(مورفولیناتوکسی)-۴،۳-تری متوكسی بنزآلدهید (۴a) در یک بالن ۵۰ میلی لیتری مجهز به مگنت، ۵ میلی مول ۷-هیدروکسی کرومأن -۴-اون ۱ میلی لیتر اتانول و

یک شبانه روز در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی-اکسید کربن انکوبه شد تا سلول‌ها به بستر چاهک‌ها متصل شده و آماده آزمایش شوند.

جهت سنجش سمیت سلولی ترکیب‌های سنتز شده از روش رنگ‌سنجدی MTT assay با استفاده از نمک ترازوپلیوم استفاده شد. ترکیب‌های سنتز شده در حلال DMSO حل شده و سپس با محیط کشت به حجم رسانده شدند تارقت - های ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آید. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۱٪ درصد بوده تا اثر سمیت این ماده به حداقل مقدار خود برسد. در صورت کدر شدن محلول در طی رقیق سازی از حداقل مقدار اسید استیک استفاده شد. از هر غلظت مقدار ۱۰ میکرو لتر در سه چاهک ریخته تا هر غلظت سه بار تکرار شود. از محیط کشت و حلال دارای سلول و فاقد ترکیبات شود. سنجش سمیت سلولی، ۱۰ میکرو لتر از محلول ۵ ملی‌گرم بر ملی‌لتر MTT به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در نهایت، محلول رویی خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل گردد. به منظور تعیین میزان جذب نوری هر چاهک که معرف میزان سلول‌های زنده آن است، جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد بقای سلولی از تقسیم میانگین جذب نوری هر گروه مورد آزمایش بر میانگین جذب نوری گروه کنترل ضرب در عدد ۱۰۰ محاسبه گردید (۲۸, ۲۷).

مطالعه داکینگ

آماده‌سازی پروتئین: جهت انجام داکینگ مولکولی ترکیب - های تهیه شده و بررسی برهمکنش‌های لیگاند-توبولین از نرم افزار MOE-2015 (Molecular Environment) استفاده شد، ابتدا ساختار کریستالوگرافی

نظر رسوب کند. سپس رسوب مورد نظر با فیلتر جدا شد و بعد از خنثی‌سازی با سود ۵ درصد، در ایزوپروپیل‌الکل کریستاله گردید تا محصول خالص جامد مورد نظر (۴a) به دست آید و در دمای اتاق خشک گردید.

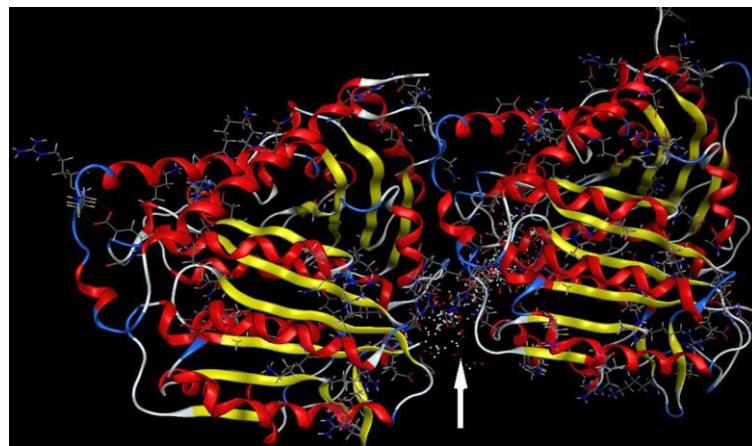
تهیه (E)-۷-(E)-۲-مورفولینو-اتوكسی (۳-۴-متوكسی بنزیلیدن) کرومانت-۴-اون (۴b): برای تهیه ترکیب (۴b)، مشابه ترکیب (۴a) عمل شد، به جز اینکه به جای ۴، ۳-تری-متوكسی بنزآلدهید از ۴-متوكسی بنزآلدهید استفاده شد.

تست سمیت سلولی رده‌های سلولی سرطان آدنوکارسینومای کلورکتال انسانی (HT-29) و رده سلولی نرمال فیبروبلاست موش (3T3) از بانک سلولی انتستیو پاستور تهران خریداری شدند. محیط کشت سلولی و پنی سبلین- استرپتومایسین (XC-A4122) از Fetal Bovine Biosera تهیه شد. تریپسین، Serum، تریپان بلو، نمک ترازوپلیوم، اتیلن دی‌آمین - تراستیک‌اسید (EDTA) از شرکت سیگما خریداری شد. همچنین دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) و اسید استیک از شرکت مرک تهیه شد.

ابتدا سلول‌ها در محیط کشت ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی سبلین- استرپتومایسین در تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت کافی و مقنن ۵٪ دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. پس از اینکه سلول‌ها به تراکم ۹۰٪ رسیدند، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک توسط ۰/۲۵ درصد تریپسین و ۰/۰۲ درصد EDTA جدا و با دور ۲۵۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد و پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زنده‌مانی بالا جهت انجام آزمایش استفاده شد. تعداد مورد نیاز سلول‌ها (۱۰ هزار سلول در ۱۰۰ میکرولیتر) به درون چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل شدند. سپس میکروپلیت‌ها به مدت

اجرای فرآیند آماده سازی ساختار (Structure Preparation) بازسازی شدن، سپس اتم های هیدروژن به Protonate ← Prepare ← Compute ← Prepare ساختار پروتئین افزوده شد، بار الکتریکی آن نیز با اجرای ساختار پروتئین تعیین و دستور Partial Charges ← Prepare ← Compute ← Prepare باکس) با استفاده از دستور Site Finder از Dummies مشخص گردید تصویر ۲ (۳۰، ۲۹).

شده توبولین (j5lyj) (PDB ID: 5lyj) از بانک اطلاعات پروتئین استخراج گردید. با بررسی توالی زنجیره ها و مولکول های موجود در ساختار پروتئین، تمامی مولکول های آب، یون منیزیم و سایر مولکول ها از پروتئین مورد نظر حذف شدند و رنجیرهای A و B به عنوان گیرنده هدف انتخاب شد ، برای حذف قسمت های اضافی ابتدا بر روی نوار ابزار SEQ کلیک شد تا توالی دقیق اسید های آمینه و مولکول های همراه نمایش داده شود. لوپ ها و ریشه های اسید آمینه از دست رفته با



تصویر ۲: جایگاه فعال پروتئین j5lyj

سنتز شده و گیرنده هدف با نرم افزار MOE-2015 انجام شد. برای انجام داکینگ از پارامترهای پیش فرض داکینگ MOE مانند Triangle Matcher Algorithm با دو عملگر GBVI/WSA و London dG استفاده شد تا ۳۰ حالت با انرژی های آزاد شده از برهم کنش های لیگاند-پروتئین ایجاد شد. بعد از انجام عمل داک، نتایج به صورت یک فایل با فرمت mdb تولید شد که شامل انرژی ها و کانفورمراهای متفاوت هر لیگاند بود؛ و در نهایت قویترین ترکیبات مشخص شدن و با استفاده از dataviewer برهم کنش های مهم بین لیگاند و پروتئین ایجاد شد (۳۰، ۲۹).

یافته ها

آماده سازی لیگاند: ابتدا ساختار دو بعدی لیگاند با نرم افزار ChemBioDrawUltra-14.00 رسم شد و سپس با استفاده از نرم افزار MOE-2015 با اجرای فرآیند Add Hydrogens ← Hydrogens ← Build ← Edite آنها هیدروژن اضافه شد و از نظر زاویه های چرخش، بار الکتریکی و انرژی با اجرای فرآیندهای Partial Charges ← Prepare ← Compute بهینه شد و با فرمت Energy Minimization ← Compute ذخیره شد و از آنها یک database ساخته شد. داکینگ مولکولی پس از تهیه فایل های مورد نیاز، داکینگ مولکولی به منظور بررسی برهمکنش مولکولی و مکانیسم احتمالی، بین ترکیبات

یافته‌های شیمیایی ترکیبات سنتز شده:

ساختار آن‌ها با روش‌های طیف سنجی مورد تائید قرار گرفت. اطلاعات مربوط به ترکیبات در جدول ۱ آورده شده است.

تبلور مجدد ترکیبات سنتز شده در ایزوپروپیل‌الکل انجام شد و نقاط ذوب آن‌ها با دستگاه نقطه ذوب گرفته شد و در نهایت

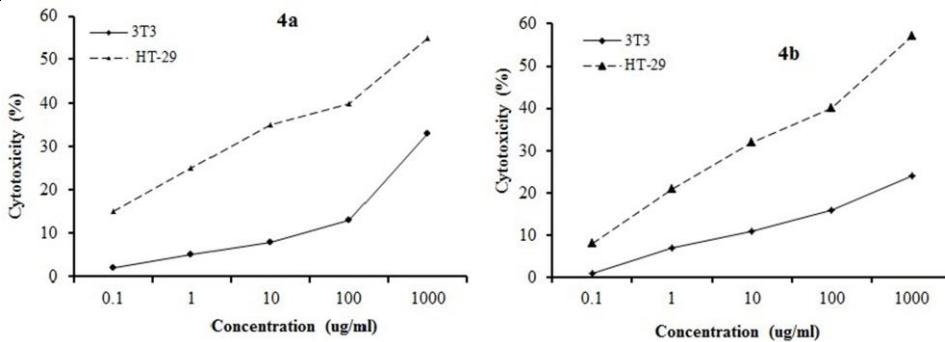
جدول ۱: اسامی شیمیایی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و طیفی ترکیبات سنتز شده

کد ترکیب	ساختار و نام شیمیایی	اطلاعات فیزیکی و شیمیایی و طیف سنجی
۴a	-Cream crystals; 65% yield; mp: 208-210°C; mw 491.87. IR (KBr, cm ⁻¹) ν_{max} : 1664, 1611. ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz), 7.84 (d, 1H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.69 (s, 1H), 6.79 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.6 and 2.4 Hz), 6.75(s, 2H), 6.65 (d, 1H, <i>J</i> = 2 Hz), 5.49 (d, 2H, <i>J</i> = 2 Hz), 4.56 (t, 2H, <i>J</i> = 4.6 Hz), 3.93 (br s, 4H), 3.83 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 3.57 (t, 2H, <i>J</i> = 4.6 Hz), 3.48 (br s, 2H), 3.20 (br s, 2H).	
۴b	-Brown crystals; 83% yield; mp: 175-178°C; mw 431.91. IR (KBr, cm ⁻¹) ν_{max} : 1728, 1663. ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz), 7.85 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.68 (s, 1H), 7.44 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.07 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 6.77 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.8 and 2 Hz), 6.65 (d, 1H, <i>J</i> = 2 Hz), 5.43 (d, 2H, H-2, <i>J</i> = 2 Hz), 4.54 (br s, 2H), 3.92 (br s, 4H), 3.82(s, 3H), 3.55 (br s, 2H'), 3.47 (br s, 2H), 3.19 (br s, 2H).	

تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت درصد سمیت سلولی افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که اثر سمیت ترکیبات بر روی سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های غیر سرطانی بوده و همچنین با توجه به نتایج حاصل از نمودار شماره ۱ می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب ۴b پروفایل اثر بهتری را نشان داده است که با نتایج حاصل از داکینک مولکولی نیز تطابق داشت.

فعالیت سمیت سلولی ترکیبات:

اثرات سمیت سلولی غلظت‌های مختلف از ترکیبات سنتز شده بر روی رده‌ی سلول سرطانی HT-29 در مقایسه با رده سلولی غیر سرطانی 3T3 با روش رنگ‌سنگی مورد بررسی قرار گرفت. اثر ترکیب ۴a و ۴b در غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۱/۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ترکیب از ۰/۱



نمودار ۱: بررسی اثرات مهار رشد سلولی ترکیب ۴a و ۴b روی رده های سلولی 3T3 و HT-29

دارد. به منظور اعتبارسنجی عملیات داکینگ مولکولی، مولکول کلشی سین (لیگاند مرجع در جایگاه فعال توبولین) همراه ترکیبات سنتز شده داک شد. نتایج نشان می دهد قدرت اتصال ترکیب ۴b نو دیک به کلشی سین می باشد؛ ولی ترکیب ۴a ضعیف تر است.

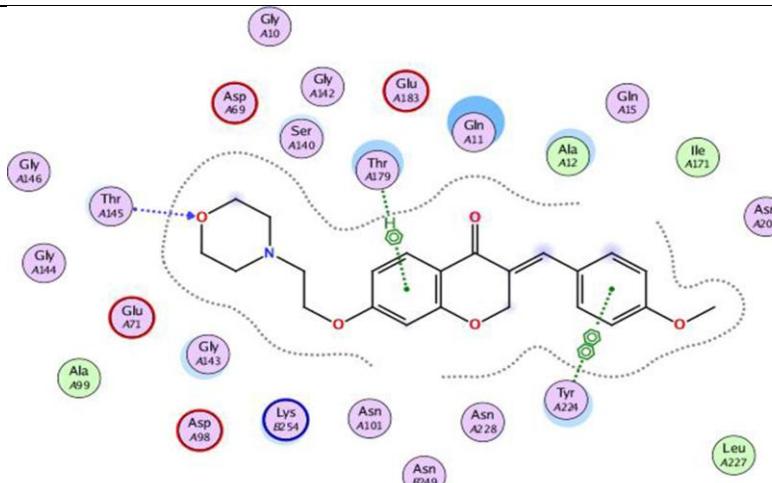
نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات سنتز شده با پروتئین توبولین در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می دهد که میزان انرژی آزاد شده در طی برهmekش لی گلند-گیرنده برای ترکیب ۴b بیشتر از انرژی آزاد شده ناشی از داکینگ ترکیب ۴a است که با داده های ناشی از بررسی سمیت سلولی مطابقت

جدول ۲: انرژی برهmekش ترکیبات ۴b, ۴a و کلشیسین با پروتئین توبولین

ΔG (Kcal/mol)	ترکیب
-7/۳۷۲۷	۴a
-7/۶۸۳۸	۴b
-7/۷۳۸۹	کلشیسین

۱۴۵ ۲۲۴ زنجیره A برهم کنش هیدروفوب و با ترئونین زنجیره A پیوند هیدروژنی برقرار کرده است

همچنین برهmekش های لیگاند ۴b با اسید آمینه های توبولین در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد ترکیب شماره ۴b با اسید های آمینه ترئونین ۱۷۹ و ترئونین



تصویر ۳: نمایش دو بعدی برهمکنش‌های لیگاند ۴b با جایگاه فعال توبولین

بحث

غیررسمی از آن‌ها در تست‌های حیوانی و در نهایت بدن انسان استفاده نمود. با این حال باید به این نکته نیز توجه داشت در صورتی که هدف از استفاده از این ترکیبات در مصارف داروسانی و درمان باشد، باید دوباره تعیین دوز شوند. به طور کلی در تحقیق حاضر نتایج کشت سلولی بر روی دو رده سلولی نرمال و سرطانی نشان می‌دهد که ترکیبات حاضر در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌ها اثرات سمی اعمال نموده اند و سلول‌های فیبروبلاستی توانایی مقابله با این ترکیبات را در غلظت‌های بالاتر را دارا می‌باشند که این امر نشان دهنده مقاومت بیشتر این سلول‌هاست. در حالی که در مورد سلول‌های سرطانی، این ترکیبات با همان غلظت، سبب مرگ و آسیب سلولی بیشتری شده‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گیری نمود که ترکیبات مذکور کفایز نظر ساختاری به هم نزدیک می‌باشند، بر روی هر رده سلولی دارای رفتارهای متفاوت می‌باشند که این اثرات ممکن است بدليل اختلاف در تعداد گروههای متوكسی می‌باشد.

شبیه‌سازی داکینگ ملکولی با نرم افزار MOE-2015 جهت بررسی برهمکنش‌های موثر بین لیگاند و پروتئین توبولین انجام گرفت و نتایج به دست آمده ثابت کرد که این ترکیبات با جایگاه فعال توبولین واکنش داده‌اند. داده‌های بدست آمده در جدول شماره ۲ (انرژی برهم کش ترکیبات ۴a، ۴b و

در این تحقیق دومشتق هوموایزوفلاؤنوئید سنتز شد. همانطور که در مولکول‌های نهایی نشان داده شده است این ترکیبات دارای گروه‌های عاملی متفاوتی می‌باشند که می‌توانند به طور بالقوه با گیرنده‌ها و مولکول‌های هدف گوناگون برهمکنش داشته باشند. در این مولکول‌ها به طور مشخص گروه‌های فنیل متوكسیله شده و α, β غیر اشبع وجود دارد که در بسیاری از ترکیبات با سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطانی مشاهده شده است (۳۱، ۳۲). تحقیقات زیادی نشان داده است که ترکیبات حاوی گروه فنیل دارای گروه متوكسی سبب مه پروتئین توبولین می‌شوند و در نتیجه مهار رشد سلول می‌شوند (۳۲). در این مطالعه، بعد از تهیه ترکیبات مورد نظر، سمیت سلولی آنها با روش MTT، بر روی یک نوع سلول سرطانی و یک نوع سلول نرمال مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش میزان حیات سلول و سمیت سلولی بعد از قرار گرفتن در معرض ترکیبات سنتز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌گونه که نتایج کشت سلولی بر روی دو رده سلولی فیبروبلاست (3T3) و آدنوکارسینومای کلورکتال انسانی (HT-29) نشان می‌دهد، ترکیبات ساخته شده در کل دارای خواص سمیت سلولی متوسطی می‌باشند که سمیت مذکور وابسته به دوز ترکیبات بوده و می‌توان با به کار بردن دوزهای

تجهیزات

در این تحقیق دو ترکیب هموایزو فلا و نوئید دارای زنجیره آلکوکسی آمین تهیه شدند و با روش‌های طیف سنجی و نقطه ذوب مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سمیت سلولی این ترکیبات ب روی دو رده سلولی فیروblast (HT-29) و آدنوکارسینومای کلورکتال انسانی (3T3) و آدنوکارسینومای کلورکتال انسانی (HT-29) با نرم افزار MOE-2015 جهت بررسی مکانیسم احتمالی این ترکیبات انجام گرفت. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب ۴b از طریق برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبیک با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال پروتئین توبولین اتصال برقرار کرده است و می‌توانند باعث مهار آن گردد.

تقدیم و تشکر

این پژوهش در قالب طرح با کد اخلاق IR.KMU.REC.1399.672 در دانشگاه علوم پزشکی کرمان مصوب شده است، لذا بدین وسیله صمیمانه از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و رئیس مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. نویسنده‌گان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

کلشیسین با پروتئین توبولین (نشان می‌دهد که انرژی اتصال ترکیب ۴b بیشتر از انرژی اتصال ناشی از ترکیب ۴a با پروتئین توبولین است و این داده‌ها با نتایج ناشی از مطالعه سمیت سلولی تطابق دارد. تحقیقات قبلی نشان داده است که $\alpha\text{Thr}179$ یکی از مهمترین اسیدهای آمینه در جایگاه فعال توبولین است که با لیگاند برهمکنش می‌کند (۳۳). نتایج بدست آمده در تصویر شماره ۳ (نمایش دو بعدی برهمکنش‌های لیگاند ۴b با جایگاه فعال توبولین) نشان می‌دهد که قسمت فنیل حلقه کروم ان ترکیب ۴b یک پیوند $\text{H}-\pi-\pi$ -stacking با اسید آمینه $\alpha\text{Thr}179$ برقرار کرده است که با تحقیقات قبل همخوانی دارد ولی ترکیب ۴a چنین برهمکنشی را نشان نداده است (۳۶-۳۴). همچنین ترکیب ۴b یک پیوند هیدروژنی از طریق اتم اکسیژن حلقة مورفولین با اسید آمینه $\alpha\text{Thr}145$ و یک پیوند $\pi-\pi$ -stacking باوسیله حلقة $\text{H}-\pi-\pi$ -stacking متوکسی فنیل با اسید آمینه $\alpha\text{Tyr}224$ برقرار کرده است. به علاوه انرژی اتصال ترکیب ۴b با پروتئین توبولین ۷/۶۸۳۸ کیلوکالری برمول است که از نظر مقداری نزدیک به انرژی اتصال کلشیسین (۷/۷۳۸۹- کیلوکالری برمول) است. به طور کلی نتایج حاصل از شیوه سازی داکینگ مولکولی و تست سمیت سلولی این ترکیبات نشان می‌دهد که توسعه و طراحی هموایزو فلا و نوئیدهای دارای زنجیره آلکوکسی آمین به عنوان ترکیبات بالقوه ضدسرطانی می‌تواند مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

منابع

- Amirkhah R, Naderi-Meshkin H, Mirahmadi M, Allahyari A, Sharifi HR. Cancer statistics in Iran: Towards finding priority for prevention and treatment. Cancer Press. 2017;3(2):27-38.
- Rahmani-Nezhad S, Safavi M, Pordeli M, Ardestani SK, 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.
- Shafiq E, Siadati S, Shefaei S. The epidemiological study of cancer in hospitals of Babol Medical University, 1990-2002. J Babol Univ Medical Sci. 2005;7(3):73-8.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34.

- 5.Amini Sani N, Shamshir Garan M, Ghavam Nasiri M, Setayesh Y. The effect of active and passive smoking associated with breast cancer. *J Babol Univ Medical Sci.* 2005;7(1):63-8.
- 6.Mousavi S, Asri M. Educational requirements of patients with cancer during chemotherapy and radiotherapy for their self-care. *J Babol Univ Medical Sci.* 2003;5(1):17-20.
- 7.Shafigh, E, Abdolazimi Y, Shafaei S, Haji Ahmadi M. Expression of p53, p27kip1and ki-67 in gastric cancer and their correlation with clinicohistopathologic parameters in shahid beheshti hospital. *J Babol Univ Medical Sci.* 2007;9(4):7-14.
- 8.Al Nakib T, Bezjak V, Meegan MJ, Chandy R. Synthesis and antifungal activity of some 3-benzylidenechroman-4-ones, 3-benzylidenethiochroman-4-ones and 2-benzylidene-1-tetralones. *Eur J Med Chem.* 1990;25(5):455-62.
- 9.Li N, Zhang J-Y, Zeng K-W, Zhang L, Che Y-Y, Tu P-F. Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus*. *Fitoterapia.* 2012;83(6):1042-5.
- 10.Tait S, Salvati AL, Desideri N, Fiore L. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antiviral Res.* 2006;72(3):252-5.
- 11.Pourshojaei Y, Gouranourimi A, Hekmat S, Asadipour A, Rahmani-Nezhad S, Moradi A, et al. Design, synthesis and anticholinesterase activity of novel benzylidenechroman-4-ones bearing cyclic amine side chain. *Eur J Med Chem.* 2015;97:181-9.
- 12.Shamsimeymandi R, Pourshojaei Y, Eskandari K, Mohammadi-Khanaposhtani M, Abiri A, Khodadadi A, et al. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics of novel cholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer's agents. *Archiv der Pharmazie.* 2019;352(7):1800352.
- 13.Pourshojaei Y, Eskandari K, Asadipour A. Highly Significant Scaffolds to Design and Synthesis Cholinesterase Inhibitors as Anti-Alzheimer Agents. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(19):1577-98.
- 14.McPherson DD, Cordell GA, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HHS. Peltogynoids and homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry.* 1983;22(12):2835-8.
- 15.McPherson DD, Che C-T, Cordell GA, Doel Soejarto D, Pezzuto JM, Fong HHS. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry.* 1985;25(1):167-70.
- 16.Roy SK, Agrahari UC, Gautam R, Srivastava A, Jachak SM. Isointricatinol, a new antioxidant homoisoflavonoid from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. *Nat Prod Res.* 2012;26(8):690-5.
- 17.Shaikh M, Petzold K, Kruger HG, du Toit K. Synthesis and NMR elucidation of homoisoflavanone analogues. *Struct Chem.* 2011;22(1):161-6.
- 18.Wang G, Liu W, Gong Z, Huang Y, Li Y, Peng Z. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of new chalcone derivatives containing diaryl ether moiety as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Chem.* 2020;95:103565.
- 19.Yang Z-M, Huang J, Qin J-K, Dai Z-K, Lan W-L, Su G-F, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-hydroxyl-3-aminoalkoxy xanthone derivatives as potent anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2014;85:487-97.
- 20.Asadipour A, Shams Z, Eskandari K, Moshafi M-H, Faghih-Mirzaei E, Pourshojaei Y. Efficient, straightforward, catalyst-free synthesis of medicinally important S-alkyl/benzyl dithiocarbamates under green conditions. *Res Chem Intermed.* 2018;44(2):1295-304.

- 21.Eskandari K, Pourshojaei Y, Haghani F, Shabani M, Asadipour A. Synthesis, and molecular modeling of bis(3-(piperazine-1-yl)propyl)tungstate (BPPT) nanoparticles, and its first catalytic application for one-pot synthesis of 4H-chromene derivatives. *Heliyon*. 2019;5(9):e02426.
- 22.Pourshojaei Y, Abiri A, Eskandari K, Haghigijoo Z, Edraki N, Asadipour A. Phenoxyethyl Piperidine/Morpholine Derivatives as PAS and CAS Inhibitors of Cholinesterases: Insights for Future Drug Design. *Sci Rep.* 2019;9(1):19855.
- 23.Pourshojaei Y, Eskandari K, Elhami E, Asadipour A. Molybdenum Oxide Nanoparticles as Recyclable Heterogeneous Catalyst for Synthesis of Arylidene Ethyl Cyanoacetates. *J Nanosci Nanotechnol.* 2019;19(9):5965-73.
- 24.Shawky AM, Ibrahim NA, Abdalla AN, Abourehab MAS, Gouda AM. Novel pyrrolizines bearing 3,4,5-trimethoxyphenyl moiety: design, synthesis, molecular docking, and biological evaluation as potential multi-target cytotoxic agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021;36(1):1313-33.
- 25.Maklad RM, AbdelHafez EMN, Abdelhamid D, Aly OM. Tubulin inhibitors: Discovery of a new scaffold targeting extra-binding residues within the colchicine site through anchoring substituents properly adapted to their pocket by a semi-flexible linker. *Bioorg chem.* 2020;99:103767.
- 26.Pourshojaei Y, Jadidi M-H, Eskandari K, Foroumadi A, Asadipour A. An eco-friendly synthesis of 4-aryl-substituted pyrano-fused coumarins as potential pharmacological active heterocycles using molybdenum oxide nanoparticles as an effective and recyclable catalyst. *Res Chem Intermed.* 2018;44(7):4195-212.
- 27.Eslaminejad T, Nematollahi-Mahani SN, Ansari M. Cationic β -Cyclodextrin-Chitosan Conjugates as Potential Carrier for pmCherry-C1 Gene Delivery. *Mol Biotechnol.* 2016;58(4):287-98.
- 28.Eslaminejad T, Nematollahi-Mahani SN, Ansari M. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of the plasmid EGFP-p53 loaded on pullulan-spermine magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2016;402:34-43.
- 29.Mabkhout YN, Aldawsari FD, Al>Showiman SS, Barakat A, Hadda TB, Mubarak MS, et al. Synthesis, bioactivity, molecular docking and POM analyses of novel substituted thieno[2,3-b]thiophenes and related congeners. *Molecules.* 2015;20(2):1824-41.
- 30.Aly OM, Beshr EA, Maklad RM, Mustafa M, Gamal-Eldeen AM. Synthesis, Cytotoxicity, Docking Study, and Tubulin Polymerization Inhibitory Activity of Novel 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxanilides. *Arch Pharm.* 2014;347(9):658-67.
- 31.Rosa GP, Seca AML, Barreto MdC, Silva AMS, Pinto DCGA. Chalcones and Flavanones Bearing Hydroxyl and/or Methoxyl Groups: Synthesis and Biological Assessments. *Appl Sci.* 2019;9(14):2846.
- 32.Bukhari SNA, Kumar GB, Revankar HM, Qin H-L. Development of combretastatins as potent tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Chem.* 2017;72:130-47.
- 33.Kamal A, Viswanath A, Ramaiah MJ, Murty JNSRC, Sultana F, Ramakrishna G, et al. Synthesis of tetrazole-isoxazoline hybrids as a new class of tubulin polymerization inhibitors. *MedChemComm.* 2012;3(11):1386-92.
- 34.McLoughlin EC, O'Boyle NM. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals.* 2020;13(1):8.

-
- 35.Pérez-Villanueva J, Matadamas-Martínez F, Yépez-Mulia L, Pérez-Koldenkova V, Leyte-Lugo M, Rodríguez-Villar K, et al. Synthesis and Cytotoxic Activity of Combretastatin A-4 and 2,3-Diphenyl-2H-indazole Hybrids. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):815.
- 36.Hura N, Naaz A, Prassanawar SS, Guchhait SK, Panda D. Drug-clinical agent molecular hybrid: synthesis of diaryl (trifluoromethyl) pyrazoles as tubulin targeting anticancer agents. *ACS omega*. 2018;3(2):1955-69.