

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

Touba Eslaminejad<sup>1</sup>, Khalil Eskandari<sup>2</sup>, Fatemeh Abedinezhad<sup>3</sup>, Bagher Amirheidari<sup>4</sup>, Ali Asadipour<sup>5</sup>, Yaghoob Pourshojaei<sup>6</sup>

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](mailto:pourshojaei@yahoo.com) and [y.pourshoja@kmu.ac.ir](mailto: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 SN<sub>2</sub> reaction of 7-hydroxychromanine 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, <sup>13</sup>CNMR, and <sup>1</sup>HNMR 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 homoisiflavonoids 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  $\alpha$ Thr179,  $\alpha$ Thr145, and  $\alpha$ Tyr224 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, Yaghoob Pourshojaei. Synthesis, Molecular Docking Study and Evaluation of Cytotoxic Activity of Two Homoisoflavonoids Containing Morpholinoethoxy Substitution. *SJKU* 2022;27(3):23-35.

## سنتر، مطالعه داکینگ مولکولی و بررسی اثر سیتوتوکسیک دو هوموایزوفلانوئید دارای استخلاف

### مورفولینواتوکسی

طوبی اسلامی نژاد<sup>۱</sup>، خلیل اسکندری<sup>۲</sup>، فاطمه عابدی نژاد<sup>۳</sup>، باقر امیرحیدری<sup>۴</sup>، علی اسدی پور<sup>۵</sup>، یعقوب پورشجاعی<sup>۶</sup>

۱. استادیار، مرکز تحقیقات فرماسیوتیکس، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارکید: ۱۵۴۲-۵۹۲۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۲. پژوهشگر، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارکید: ۷۳۲۴-۲۹۱۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. دکتر داروسازی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارکید: ۰۸۳۵-۶۵۳۵-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و مرکز تحقیقات فرماسیوتیکس، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارکید: ۴۲۸۶-۱۰۸۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۵. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران کد ارکید: ۲۱۹۵-۱۴۴۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۶. استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۳۴۳۲۳۱۵۰۰۱، پست الکترونیک:

pourshojaei@yahoo.com، کد ارکید: ۷۳۶۱-۶۹۹۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** شیمی درمانی یکی از رایج ترین راه های 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. هوموایزوفلانوئیدها ترکیبات طبیعی شناخته ای هستند که دارای فعالیت های فارماکولوژیک وسیعی هستند؛ بنابراین سنتر و ارزیابی سمیت سلولی هوموایزوفلانوئیدهای حاوی مورفولینواتوکسی همراه با شبیه سازی داکینگ مولکولی مورد توجه قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** دو ۷-مورفولینواتوکسی هوموایزوفلانوئید در طی سه مرحله سنتر شدند. مرحله اول شامل یک واکنش  $SN_2$  بود که ۷-هیدروکسی کرمانون با مورفولینواتیل کلرید هیدروکلورید در محیط بازی و تحت شرایط رفلاکس واکنش داد تا حد واسط ۳ به دست آید، در مرحله دوم تراکم آلدولی حد واسط اخیر با آلدیدهای مناسب در مجاورت HCl گازی در حلال اتانول صورت گرفت و در نهایت خنثی سازی با سود ۵ درصد انجام شد. ساختار محصولات با روش های  $^1H$ NMR،  $^{13}C$ NMR و IR تایید و سپس سمیت سلولی ترکیبات بر روی رده های سلولی HT-29 و 3T3 ارزیابی شد. برای بررسی طرز اتصال ترکیبات با پروتئین توبولین، شبیه سازی داکینگ با استفاده از MOE انجام شد.

**یافته ها:** دو مشتق مورفولینواتوکسی هوموایزوفلانوئید با راندمان تولید متوسط تا خوب تهیه شد. ارزیابی سمیت سلولی این ترکیبات، فعالیت رضایت بخشی را حاصل کرد. نتایج شبیه سازی داکینگ مولکولی، انرژی اتصال قابل قبولی از واکنش بین لیگاند با جایگاه اتصال پروتئین توبولین را نشان داد: (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۴-متوکسی بنزیلیدن) کرومان-۴-اون برابر با ۷/۶۸۳۸- و (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۳ و ۴ و ۵-تری متوکسی بنزیلیدن) کرومان-۴-اون، ۷/۳۷۲۷- کیلو کالری بر مول انرژی آزاد کردند.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که ترکیب (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۴-متوکسی بنزیلیدن) کرومان-۴-اون سمیت سلولی بیشتری نسبت به ترکیب (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۳ و ۴ و ۵-تری متوکسی بنزیلیدن) کرومان-۴-اون در مقابل رده های سلولی HT-29 و 3T3 دارد. نتایج مطالعات کامپیوتری، نتایج به دست آمده از آزمایش های برون تنی را تایید کرد و سه برهمکنش بین لیگاند (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی)-۳-(۴-متوکسی بنزیلیدن) کرومان-۴-اون و اسیدهای آمینه  $\alpha$ Thr۱۷۹،  $\alpha$ Thr۱۴۵ و  $\alpha$ Tyr۲۲۴ در جایگاه فعال توبولین نشان داد.

**واژه های کلیدی:** داکینگ مولکولی، سیتوتوکسیک، هوموایزوفلانوئید

وصول مقاله: ۹۹/۱۲/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱۰

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 شیمیایی 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 (۱-۴) و تحقیقات بسیار زیادی در این زمینه صورت پذیرفته است (۵-۷).

هوموایزوفلاونوئیدها (homoisoflavonoid) نوعی از ترکیبات طبیعی جدا شده از گیاهان متعددی هستند که ساختار شیمیایی آن‌ها شامل دو حلقه آروماتیک (فیل) و یک حلقه هتروسیکل (heterocycle) غیر آروماتیک (dihdropyran-4-one) است. هوموایزوفلاونوئیدها 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 هوموایزوفلاونوئیدی‌ها صورت پذیرفته است. این نوع از ترکیبات و ترکیبات مرتبط، فعالیت‌های زیستی فراوانی شامل: فعالیت ضد قارچی (۸)، ضد التهابی (۹)، ضد ویروسی (۱۰)، مهار استیل کولین استرازی (۱۱-۱۳) و سمیت سلولی (۱۴) از خود نشان داده‌اند. در میان محصولات طبیعی حاوی ساختار هوموایزوفلاونوئید، بوندوسلین (Boducellin) به عنوان

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

با توجه به اینکه در بسیاری از ترکیب‌های دارای اثر سمیت سلولی گروه فیل حاوی استخلاف متوکسی (۱۸) و زنجیره آلکوکسی آمین (۱۹) وجود دارد و در ادامه فعالیت‌های گروه تحقیقاتی ما بر روی سنتز ترکیبات فعال زیستی یا به طور بالقوه زیستی (۲۰-۲۳)، در این تحقیق دو مشتق هوموایزوفلاونوئید (از دسته ۵ هوموایزوفلاونوئیدها، ۳-بنزیلیدن-۴-کرومانون‌ها) دارای گروه‌های متوکسی و زنجیره آلکوکسی آمین سنتز شد و اثرات سیتوتوکسیک آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال مورد ارزیابی قرار گرفت. رابطه ساختار و فعالیت یک دسته از مهارکننده‌های توبولین، نشان می‌دهد که اتصال حلقه‌های آروماتیک حاوی گروه متوکسی که از طریق یک پیونددهنده (Spacer)، حلقه، پیوند دوگانه، آمید و ایمین) که به حلقه‌ی آروماتیک یا هتروسیکل متصل شده‌اند فعالیت مهارکننده‌گی توبولین دارند؛ به عبارت دیگر یکی از مکانیسم‌های ضد سرطان‌ی ترکیب‌های دارای استخلاف متوکسی فیل، مهار پلیمریزاسیون توبولین است (۲۴، ۲۵)، لذا داکینگ مولکولی ترکیبات سنتز شده در این پژوهش، حلقه فیل حاوی گروه متوکسی که از طریق پیوند دوگانه به حلقه 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 ۷-۲-مورفولینواتوکسی (کرومان-۴-اون ۳: ابتدا در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری مجهز به مگنت، ۵ میلی مول ۷-هیدروکسی کرومان-۴-اون ۲ و ۵۰ میلی لیتر DMF و سپس ۰/۳ مول درصد  $K_2CO_3$  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 مورفولینواتیل کلرید هیدروکلرید به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ۴ ساعت رفلاکس شد. پیشرفت واکنش تا مصرف شدن کامل مواد اولیه با استفاده از TLC پیگیری شد. پس از پایان واکنش مخلوط 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 واسط ۳ به صورت خالص به دست آمد (۱۱، ۲۶).

مواد اولیه شیمیایی به کار رفته در این پژوهش همه از کارخانه مرک یا آلدریچ خریداری و بدون خالص سازی استفاده شده‌اند. حلال‌های 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 بشت CAS (CAS Number) برابر به ۶۸۱۲۲، اتیل - 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، طیف مادون قرمز (IR) با استفاده از دستگاه Bruker، طیف رزونانس مغناطیسی (NMR) با دستگاه اسپکترومتر Bruker (400 MHz) تهیه گردید و جایجایی شیمیایی ( $\delta$ ) بر حسب ppm در مقایسه با شاهد داخلی تترامتیل سیلان (TMS) گزارش شد.

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

مورفولینواتوکسی (کرومان-۴-اون ۳ و ۱ میلی مول ۵،۴،۳-تری متوکسی تری متوکسی بنزآلدئید افزوده و سپس تحت هم‌زدن، به مدت ۵ دقیقه گاز هیدروژن کلرید در آن دمیده شد تا محصول مورد

تهیه (E)-۷-۲-مورفولینواتوکسی (۳-۴،۳-۵،۴،۳-تری متوکسی بنزآلدئید) کرومان-۴-اون ۴a: در یک بالن ۵۰ میلی لیتری مجهز به مگنت، ۵ میلی لیتر اتانول و ۱ میلی مول ۷-۲-

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

جهت سنجش سمیت سلولی ترکیب های سنتز شده از روش رنگ سنجی MTT assay با استفاده از نمک ترازولیوم استفاده شد. ترکیب های سنتز شده در حلال DMSO حل شده و سپس با محیط کشت به حجم رسانده شدند تا رقت های ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آید. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون ها کمتر از ۰/۱ درصد بوده تا اثر سمیت این ماده به حداقل مقدار خود برسد. در صورت کدر شدن محلول در طی رقیق سازی از حداقل مقدار اسیداستیک استفاده شد. از هر غلظت مقدار ۱۰ میکرو لیتر در سه چاهک ریخته تا هر غلظت سه بار تکرار شود. از محیط کشت و حلال دارای سلول و فاقد ترکیبات سنتز شده به عنوان شاهد منفی استفاده شد. جهت انجام آزمون سنجش سمیت سلولی، ۱۰ میکرو لیتر از محلول ۵ مطلق گرم بر مطلق لیتر 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 لیتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل گردد. به منظور تعیین میزان جذب نوری هر چاهک که معرف میزان سلول های 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 (۲۷، ۲۸).

#### مطالعه داکینگ

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

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

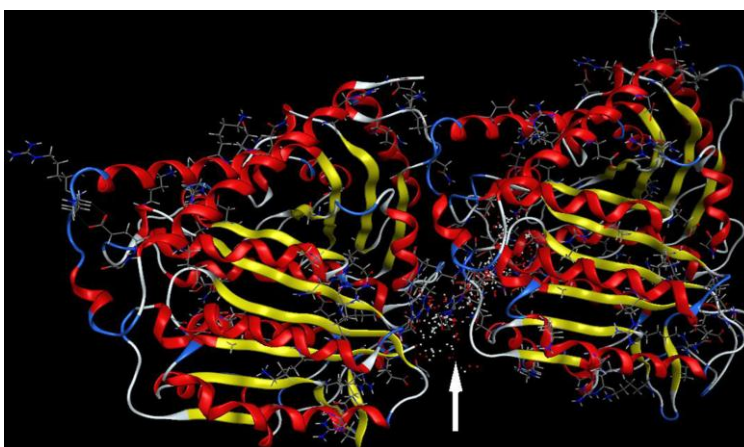
تهی ه (E)-۷-(۲-مورفولینواتوکسی) -۳-(۴-متوکسی بنریلیدن) کرومان-۴-اون ۴b. برای تهیه ترکیب ۴b، مشابه ترکیب ۴a عمل شد، به جز آنکه به جای ۵،۴،۳-تری - متوکسی بنزآلدئید از ۴-متوکسی بنزآلدئید استفاده شد. تست سمیت سلولی

رده های سلولی سرطان آدنوکارسینوما کولورکتال انسانی (HT-29) و رده سلولی نرمال فیروبیلاست موش (3T3) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. محیط کشت سلولی و پنی سیلین - استرپتومایسین (XC-A4122) از شرکت Biosera تهیه شد. تریپسین، FBS (Fetal Bovine Serum)، تریپان بلو، نمک ترازولیوم، اتیلن دی آمین - تتراسیتیک اسید (EDTA) از شرکت سیگما خریداری شد. همچنین دی متیل سولفوکسید (DMSO) و اسید استیک از شرکت مرک تهیه شد.

ابتدا سلول ها در محیط کشت ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین در تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت کافی و میزان ۵٪ دی اکسیژن کربن انکوبه شدند. پس از آنکه سلول ها به تراکم ۹۰٪ رسیده اند، سلول های چسبیده به کف فلاسک توسط ۲۵٪ در صد تریپسین و ۰/۰۲ درصد EDTA جدا و با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده مانی سلول ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتمتر توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد و پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول های با درصد زنده مانی بالا جهت انجام آزمایش استفاده شد. تعداد مورد نیاز سلول ها (۱۰ هزا ر سلول در ۱۰۰ میکرو لیتر) به درون چاهک های میکرو پلیت ۹۶ تایی منتقل شدند. سپس میکرو پلیت ها به مدت

شده توبولین (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 دقیقی اسیدهای آمینه و مولکول های همراه نمایش داده شود. لوپها و ریشه های اسید آمینه از دست رفته با

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



تصویر ۲: جایگاه فعال پروتئین 5lyj

آماده سازی لیگاند: ابتدا ساختار دوبعدی لیگاند با نرم افزار ChemBioDrawUltra-14.00 رسم شد و سپس با استفاده از نرم افزار MOE-2015 با اجرای فرآیند Edit←Build←Hydrogens←Add Hydrogens به آن ها هیدروژن اضافه شد و از نظر زاویه های چرخش، بار الکتریکی و انرژی با اجرای فرآیندهای Compute←Prepare←Partial Charges و Compute←Energy Minimization بهینه شد و با فرمت mdb ذخیره شد و از آن ها یک database ساخته شد. داکینگ مولکولی

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 London dG و GBVI/WSA 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 کانفورمرهای متفاوت هر لیگاند بود؛ و در نهایت قویترین ترکیبات مشخص شدند و با استفاده از dataviewer برهم کنش های مهم بین لیگاند و پروتئین ایجاد شد (۲۹، ۳۰).

پس از تهیه فایل های مورد نیاز، داکینگ مولکولی به منظور بررسی برهمکنش مولکولی و مکانیسم احتمالی، بین ترکیبات

#### یافته ها

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

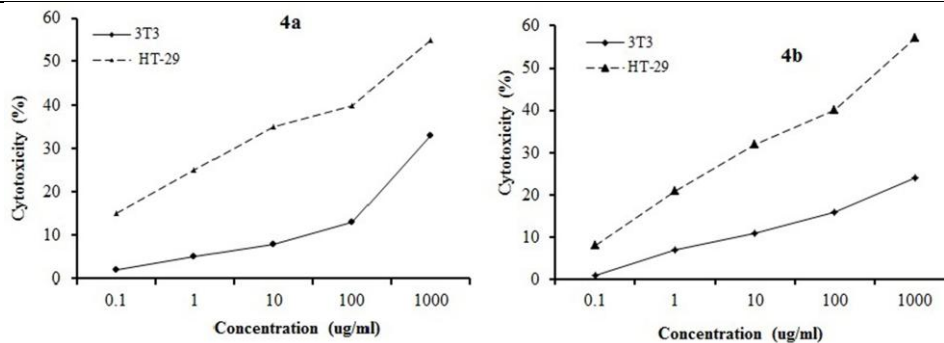
یافته‌های شیمیایی ترکیبات سنتز شده: تبلور مجدد ترکیبات سنتز شده در ایزوپروپیل الکل انجام شد و نقاط ذوب آن‌ها با دستگاه نقطه ذوب گرفته شد و در نهایت

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

کد ترکیب	ساختار و نام شیمیایی	اطلاعات فیزیک و شیمیایی و طیف سنجی
۴a	-Cream crystals; 65% yield; mp: 208-210°C; mw 491.87. IR (KBr, cm <sup>-1</sup> ) v <sub>max</sub> : 1664, 1611. <sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), 7.84 (d, 1H, J= 8.6 Hz), 7.69 (s, 1H), 6.79 (dd, 1H, J= 8.6 and 2.4 Hz), 6.75(s, 2H), 6.65 (d, 1H, J= 2 Hz), 5.49 (d, 2H, J= 2 Hz), 4.56 (t, 2H, J= 4.6 Hz), 3.93 (br s, 4H), 3.83 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 3.57 (t, 2H, J= 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 <sup>-1</sup> ) v <sub>max</sub> : 1728, 1663. <sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), 7.85 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 7.68 (s, 1H), 7.44 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 7.07 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.77 (dd, 1H, J= 8.8 and 2 Hz), 6.65 (d, 1H, J= 2 Hz), 5.43 (d, 2H, H-2, J= 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 می یابد. نتایج نشان می دهد که اثر سمیت ترکیبات بر روی سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های غنی سرطانی بوده و همچنین با توجه به نتایج حاصل از نمودار شماره ۱ می توان نتیجه گرفت که ترکیب ۴b پروفایل اثر بهتری را نشان داده است که با نتایج حاصل از داکینگ 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 غنی سرطانی 3T3 با روش رنگ سنجی مورد بررسی قرار گرفت. اثر ترکیب ۴a و ۴b در غلظت‌های مختلف (۰/۱ تا 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 بر روی رده های سلولی 3T3 و HT-29

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

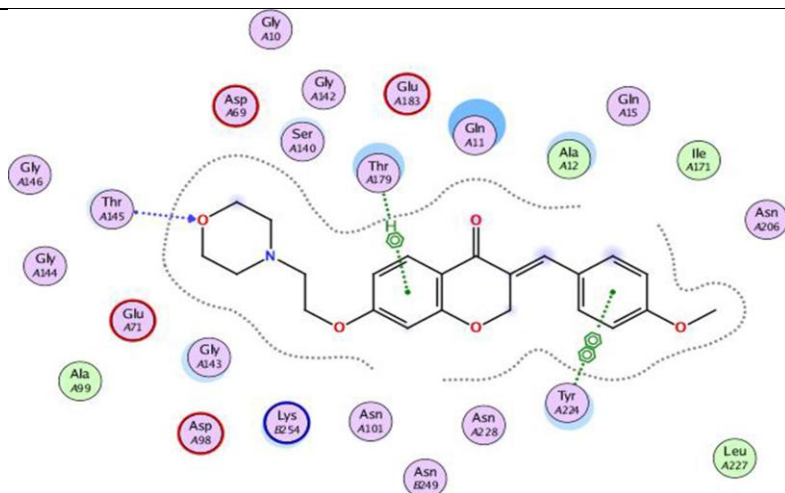
نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات سنتز شده با پروتئین توبولین در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می دهد که میزان انرژی آزاد شده در طی برهمکنش لی گاند-گیرنده برای ترکیب ۴b بیشتر از انرژی آزاد شده ناشی از داکینگ ترکیب ۴a است که با داده های ناشی از بررسی سمیت سلولی مطابقت

جدول ۲: انرژی برهم کنش ترکیبات ۴a، ۴b و کلشی سین با پروتئین توبولین

ترکیب	$\Delta G$ (Kcal/mol)
۴a	-۷/۳۷۲۷
۴b	-۷/۶۸۳۸
کلشی سین	-۷/۷۳۸۹

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

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



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

### بحث

در این تحقیق دوشمق هوموایزوفلاونوئید سنتز شد. همانطور که در مولکول‌های نهایی نشان داده شده است این ترکیبات دارای گروه‌های عاملی متفاوتی می‌باشند که می‌توانند به‌طور بالقوه با گیرنده‌ها و مولکول‌های هدف گوناگون برهمکنش داشته‌باشند. در این مولکول‌ها به‌طور مشخص گروه‌های فنیل متوکسیله شده و  $\beta, \alpha$  غیر اشباع وجود دارد که در بسیاری از ترکیبات با سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطانی مشاهده شده است (۱۸, ۳۱). تحقیقات زیادی نشان داده است که ترکیبات حاوی گروه فنیل دارای گروه متوکسی سبب مه‌ار 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، بروی یک نوع سلول سرطانی و یک نوع سلول نرمال مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش میزان حیات سلول و سمیت سلولی بعد از قرارگرفتن در معرض ترکیبات سنتز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌گونه که نتایج کشت سلولی بر روی دو رده سلولی فیبروبلاست (3T3) و آدنوکارسینوما کلوئرکتال 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

غیرسمی 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 دارورسانی و درمان باشد، باید دوباره تعیین دوز شوند. به‌طور 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 نموده‌اند 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 نتیجه‌گیری نمود که ترکیبات مذکور کفاز نظر ساختاری به هم نزدیک می‌باشند، بر روی هر رده سلولی دارای رفتارهای متفاوتی می‌باشند که این اثرات ممکن است بدلیل اختلاف در تعداد گروه‌های متوکسی 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 برهم‌کنش ترکیبات ۴a، ۴b و

### نتیجه گیری

در این تحقیق دو ترکیب هوموایزوفلا و نونئید دارای زنجیره آلکوکسی آمین تهیه شدند و با روش های طیف سنجی و نقطه ذوب مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سمیت سلولی این ترکیبات ب روی دو رده سلولی فیروبلاست (3T3) و آدنوکارسینوما کولورکتال انسانی (HT-29) وابسته به غلظت می باشد و سلول های نوزاد مقاومت بیشتری از خود نشان داده اند. شبیه سازی مولکولی داکینگ این ترکیبات 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 برهمکنش های هیدروژنی و هیدروفوبیک با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال پروتئین توبولین اتصال برقرار کرده است و می تواند باعث مهار آن گردد.

### تقدیر 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 می آید. نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

کلشیسین با پروتئین توبولین ( نشان می دهد که انرژی اتصال ترکیب ۴b بیشتر از انرژی اتصال نا شی از ترکیب ۴a با پروتئین توبولین است و این داده ها با نتایج ناشی از مطالعه سمیت سلولی تطابق دارد. تحقیقات قبلی نشان داده است که  $\alpha$ Thr179 یکی از مهمترین اسیدهای آمینه در جایگاه فعال توبولین است که با لیگاند برهمکنش می کند (۳۳). نتایج بدست آمده در تصویر شماره ۳ (نمایش دو بعدی برهمکنش- های لیگاند ۴b با جایگاه فعال توبولین ) نشان می دهد که قسمت فنیل حلقه کروم ان ترکیب ۴b یک پیوند  $\pi$ -H stacking با اسید آمینه  $\alpha$ Thr179 برقرار کرده است که با تحقیقات قبل همخوانی دارد ولی ترکیب ۴a چنین برهمکنشی را نشان نداده است (۳۴-۳۶). همچنین ترکیب ۴b یک پیوند هیدروژنی از طریق اتم اکسیژن حلقه مورفولین با اسید آمینه  $\alpha$ Thr145 و یک پیوند  $\pi$ - $\pi$  stacking بوسیله حلقه متوکسی فنیل با اسید آمینه  $\alpha$ Tyr224 برقرار کرده است. به - علاوه انرژی اتصال ترکیب ۴b با پروتئین توبولین  $-7/6838$  کیلو کالری برمول است که از نظر مقداری نزدیک به انرژی اتصال کلشیسین ( $-7/7389$  کیلو کالری برمول) است. به طور کلی نتایج حاصل از شبیه سازی داکینگ مولکولی و تست سمیت سلولی این ترکیبات نشان می دهد که توسعه و طراحی هوموایزوفلا و نونئیدهای دارای زنجیره آلکوکسی آمین به عنوان ترکیبات بالقوه ضدسرطانی می تواند مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

### منابع

1. 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.
2. 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.
3. Shafiqh 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.
4. 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, p27kip1 and 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. Shamsimeymani 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. Isointrinsicatinol, 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, Faghieh-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, Haghijoo 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  $\beta$ -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. Mabkhot 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.