

سنجش سمیت سلولی ۱۶ مشتق کینولون جدید بر مجموعه‌ای از رده‌های سلولی بدخیم در محیط کشت

سعید رجبعلیان^{۱*}، دکتر علی رضا فرومدی^۲، دکتر محمود رضا حیدری^۳، دکتر ریحانه کریم زاده^۴، دکتر عباس پرداختی^۵ و رفعت حسینی^۱

خلاصه

مقدمه: فلوروکینولون‌ها از قبیل سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین مهارکننده قدرتمند آنزیم توپوایزومراز II باکتریایی هستند. همچنین فلوروکینولون‌ها فعالیت آنزیم توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران را نیز مهار می‌کنند، که بدین ترتیب اثرات ضد توموری این گروه از ترکیبات قابل بررسی است.

روش: در مطالعه حاضر سمیت سلولی یک سری از مشتقات جدید فلوروکینولون بر شش رده سلولی بدخیم با روش سنجش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: مشتقات N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- اکسواتیل} (C1,N1,E1)، N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- تینیل} (C2,N2,E2) و N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- فنیل} (C3,N3,E3) پیرازینیل کینولون‌ها بیشترین سمیت سلولی را با میانگین IC50 های برابر با ۲/۵ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند که با فعالیت داروی اتوپوزاید با IC50 برابر با ۱/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر هم‌تراز بود. کاهش فعالیت به دنبال جایگزینی ۵- برومو-۲- تینیل با ۴،۲- دی فلوروفنیل یا ۴- فلوروفنیل مشاهده شد. فعالیت کینولون به خصوص بر رده سلولی آدنوکارسینومای کلیه (ACHN) به دنبال اتصال یک اتم کلر و دو اتم فلور به گروه‌های بنزیل و فنیل افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه این سری از مشتقات کینولون را به عنوان مدل‌های مناسب برای طراحی ترکیبات ضد توموری جدید پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: فلوروکینولون، سنجش MTT، سمیت سلولی، اتوپوزاید

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- دانشیار داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران ۳- استاد سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۵- استادیار، دانشکده داروسازی و مرکز فن آوری فرماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

* نویسنده مسؤول: مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: srajabalian@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۱۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۲/۱ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۱/۲۲

مقدمه

DNA توپوایزومرازها برای بقاء و تکثیر سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی ضروری هستند. ترکیبات شیمیایی فلوروکینولون از قبیل سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین دارای اثرات ضد میکروبی شناخته شده هستند. فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات از طریق مهار آنزیم DAN ژیراز اعمال می‌شود (۲۴، ۲۹). گروهی از مشتقات کینولون همچون فعالیت آنزیم توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران را نیز مهار می‌کنند. اثرات ضد توموری بسیاری از داروهای ضد توموری رایج نظیر اتوپوزاید از طریق مهار فعالیت توپوایزومرازها اعمال شده که بدین ترتیب اثرات ضد توموری مشتقات کینولون نیز قابل بررسی است (۹، ۱۰، ۱۶، ۲۵). همواره یک رابطه قوی بین فعالیت کینولون و ساختمان شیمیایی آن وجود داشته است (۵، ۲۳، ۲۶). بنابر این غربال‌گری سمیت سلولی مشتقات کینولون، شناسایی ترکیبات ضد توموری جدید را ممکن می‌سازد و طراحی و ساخت ترکیبات مؤثرتر را نیز هدایت می‌کند.

فعالیت کینولون به حلقه‌های هتروآروماتیک و استخلاف‌های محیطی آن بستگی دارد. مولکول از طریق عوامل کربوکسیل و کتو مستقر در کربن‌های شماره سه و چهار و عوامل مستقر در کربن شماره شش و هفت با DNA و آنزیم توپوایزومراز درگیر می‌شود (۳، ۶). کربن شماره هفت کینولون جایگاه مناسبی برای اتصال گروه‌های طویل و پر حجم گزارش شده است (۲۶).

بررسی فعالیت ضد توموری ۹۰ مشتق کینولون در یک مدل موشی سرطان خون، ارتباط بین فعالیت ضد توموری و حضور هالوژن‌ها در کربن‌های شماره شش و هشت و گروه سیکلوپروپیل در نیتروژن شماره یک کینولون را نشان داده است (۲۸). در مطالعات دیگر، اتصال گروه ۴-هیدروکسی فیل به کربن شماره هفت در ۶-۸ دی فلوروکینولون سمیت سلولی قابل مقایسه با داروی اتوپوزاید را در پی داشته است (۲۰، ۲۱). همچنین جانشینی پیرازین کلروفنیل شده در کربن شماره هفت، سمیت سلولی قابل

توجهی به خصوص در رده‌های سلولی کارسینومای کلیه همراه داشته است (۶). Arakawa و همکارانش فعالیت ضد توموری قابل توجه مشتقات فلوروکینولون را به دنبال اتصال گروه غیر اشباع aminoazabicyclo به کربن شماره هفت در مدل موشی سرطان پستان گزارش کردند (۱).

ما اخیراً گروهی از مشتقات ۷-پیرازینیل فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و انوکساسین را به منظور شناسایی ساختمان‌های شیمیایی ضد میکروبی با روش‌های متداول ساخت این گروه از ترکیبات سنتز کرده‌ایم (۷، ۸). در مطالعه حاضر سمیت سلولی ۱۶ مشتق فلوروکینولون که در جریان مطالعات فوق سنتز شده‌اند بر شش رده سلولی بدخیم با روش MTT assay بررسی شده است.

روش بررسی

سنتزهای شیمیایی

مشتقات کینولون استفاده شده در این مطالعه بر اساس روشی که اخیراً گزارش شده است سنتز شدند (۷، ۸). ساختمان‌های شیمیایی ترکیبات استفاده شده در این تحقیق در جدول یک آورده شده است.

رده‌های سلولی و کشت سلول

رده‌های سلولی A549 (کارسینومای ریه انسان)، ACHN (کارسینومای کلیه)، SK-Mel-3 (ملانومای بدخیم انسان)، EJ (کارسینومای مثانه) و HEPG-2 (کارسینومای کبد) از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شدند. رده سلولی REFY-1 در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان از کشت بافت تومور گلیو بلاستوما مولتی فورم یک زن ۶۰ ساله در سال ۱۳۸۳ تهیه شده است. رده سلولی فوق با زمان تقسیم سلولی ۱۹ ساعت تاکنون بیش از ۱۵۰ مرتبه پاساژ شده است. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین کشت شدند. پاساژ کشت‌ها با محلول تریپسین-EDTA انجام شد. شمارش سلول با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی

IC50ها (غلظتی از دارو که ۵۰ رشد سلول را نسبت به کشت کنترل کاهش دهد) از طریق معادله رگرسیون غیر خطی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت مشتقات محاسبه شد.

نتایج

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از نورفلوکساسین سمیت سلولی هفت مشتق کینولونی از نورفلوکساسین (مشتقات N1 تا N7) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. مشتقات N3, N2, N1 با میانگین IC50 های برابر با ۲/۹، ۲/۳ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت را بر رده‌های سلولی اعمال کردند. مشتق N4 با میانگین IC50 برابر با ۲۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر پایین‌ترین فعالیت را نشان داد. نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به این گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. رده سلولی ACHN با IC50 های برابر ۴۸، ۱۷/۳ و ۴۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین مقاومت را به ترکیبات N5, N4 و N6 نشان داد در حالی که رده سلولی REYF-1 با IC50 های بین ۱/۴ تا ۷/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین حساسیت را در برابر این گروه از ترکیبات نمایش داده است. مشتقات N5 و N6 با IC50 های برابر ۱/۴ و ۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت معادل با اتوپوزاید بر رده‌های سلولی REYF-1 و HEPG-2 اعمال کردند. نتایج مشابهی با ترکیبات N2, N1 و N3 به دست آمد.

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از سیپروفلوکساسین

سمیت سلولی شش مشتق کینولونی از سیپروفلوکساسین (مشتقات C1 تا C6) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. مشتقات C3, C2, C1 با میانگین IC50 های برابر با ۲/۴ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت را بر رده‌های سلولی اعمال کردند. ترکیبات C6, C5, C4 با میانگین IC50 های برابر با ۱۹/۵ تا ۲۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر پایین‌ترین فعالیت را نشان دادند. نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به این

آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵٪ بود.

سنجش سمیت سلولی مشتقات کینولون

سمیت سلولی مشتقات کینولون با روش MTT assay سنجش شد (۱۷). ترکیبات کینولون در حلال DMSO حل شده و در پروت ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند. در سرتاسر این مطالعه از کشت‌های سلولی در فاز رشد و تکثیر استفاده شد. ابتدا صد میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت کامل به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های لگاریتمی دارو (۰/۳ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید. بدین ترتیب رقت نهایی بین ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. هر رقت دارو در سه چاهک سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل به عنوان کنترل استفاده شد. مقدار DMSO محیط کشت در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشتقات کینولون کمتر از ۰/۱ درصد بود. پلیت‌ها در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر شامل پنج درصد CO₂ و ۹۵ درصد هوا به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و پلیت به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستال‌های رنگ فورمازان رسوب یافته در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شد. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر و فرانس ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید. تمامی مراحل آزمون سه مرتبه تکرار شد.

آنالیز نتایج

درصد رشد و تکثیر سلول در هر رقت دارو با استفاده از رابطه زیر تعیین شد:

شدت جذب بلاک - شدت جذب در حضور دارو

درصد سلول‌های زنده = $\frac{\text{شدت جذب بلاک}}{\text{شدت جذب کنترل}} \times 100$

شدت جذب بلاک - شدت جذب کنترل

اتیل (ترکیبات N3, N2, N1, E3, E2, E1) مشاهده نشد. Robinson و همکارانش در دو مطالعه جداگانه (۲۱، ۲۰) کاهش فعالیت دی‌فلورو کینولون را از ۹ میکرومول به ۷۰ میکرومول به دنبال جایگزینی گروه سیکلوپروپیل با گروه اتیل گزارش کردند که با نتایج کسب شده در مطالعه حاضر هماهنگ نیست. اختلاف نتایج احتمالاً به دلیل متفاوت بودن استخلاف‌های محیطی حلقه‌های کینولون در مطالعه ما نسبت به مطالعه فوق است. محققین در تأیید احتمال فوق به این نکته اشاره داشته‌اند که یک موقعیت در حلقه‌های کینولون به تنهایی تعیین‌کننده فعالیت مولکول نیست و همکاری مجموعه استخلاف‌های محیطی در فعالیت مولکول نقش ایفاء می‌کنند (۲۳). تغییری در فعالیت مشتقات C3, N3, E3 به دنبال جایگزینی گروه فنیل متوکسی‌ایمینو با گروه‌های اکسیم (ترکیبات C2, N2, E2) و اکسو (ترکیبات C1, N1, E1) مشاهده نشد. مشاهدات فوق با توجه به اینکه ۵- برومو-۲- تینیل در تمامی ۹ مشتق فوق حضور دارد بر نقش کلیدی آن در فعالیت این گروه از ترکیبات تأکید می‌کند. همچنین به دنبال جایگزینی ۵- برومو-۲- تینیل (مشتقات N3 و C3) با گروه فلوروفنیل (مشتقات N4 و C4) سمیت سلولی کینولون کاهش یافت که بر اهمیت حضور بروموتینیل در فعالیت این گروه از ترکیبات تأکید می‌کند. بررسی نتایج افزایش فعالیت مشتقات C4 و N4 را به دنبال جایگزینی گروه‌های فلوروفنیل و یا فنیل‌متوکسی‌ایمینو با گروه‌های ۴،۲- دی‌فلوروفنیل و یا ۴- فلوروفنیل متوکسی‌ایمینو (مشتقات C5, C6, N5, N6, N7) نشان می‌دهد. هماهنگ با این نتایج افزایش فعالیت به دنبال حضور هالوژن‌ها در حلقه‌های کینولون گزارش شده است (۲۳).

نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به برخی از مشتقات کینولون نشان می‌دهد. به عنوان مثال، سلول‌های HEPG-2 و REYF-1 نسبت به چهار رده سلولی دیگر حساسیت بیشتری به ترکیبات N5 و N6 نشان داده‌اند. Kim و همکارانش حساسیت مجموعه‌ای از رده‌های سلولی را به گروهی از ترکیبات شیمیایی با توانایی عبور مولکول

گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. رده سلولی ACHN با IC50های بین ۳۴ تا ۵۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر مقاومت بالایی را در برابر ترکیبات C5, C4 و C6 نشان داد در حالی که رده‌های سلولی Skmel-3, HEPG-2 و A549 با IC50های کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حساسیت بالایی در برابر این گروه از ترکیبات نشان دادند. تعدادی از ترکیبات این گروه شامل C2, C1 و C3 سمیت سلولی معادل با داروی اتوپوزاید اعمال کردند.

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از انوکساسین

سمیت سلولی سه مشتق کینولونی از انوکساسین (مشتقات E1 تا E3) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. ترکیبات این گروه با میانگین IC50های بین ۲/۵ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر سمیت برابر بر رده‌های سلولی اعمال کردند. نتایج این مطالعه حساسیت یکسان رده‌های سلولی را به این گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. همچنین این گروه از ترکیبات (مشتقات E1 تا E3) فعالیتی هم‌تراز با اتوپوزاید نشان دادند.

بحث

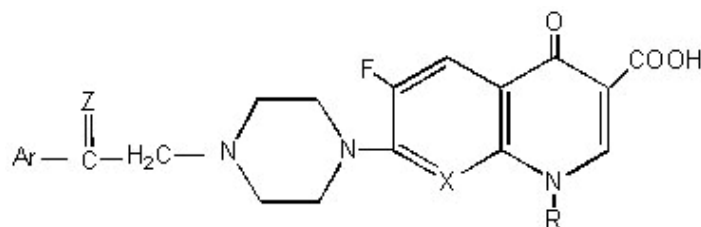
ترکیبات شیمیایی آنتی باکتریال فلوروکینولونی از طریق تداخل در عملکرد DNA ژیراز فعالیت می‌کنند (۲۹). شباهت‌های بسیار در مکانیسم عمل و توالی اسیدهای آمینه بین DNA ژیراز باکتری و توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران، اثر ضد توموری این گروه از ترکیبات را مطرح می‌کند (۹، ۱۰). بنابر این در این مطالعه سمیت سلولی ۱۶ ترکیب مشتق شده از فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و انوکساسین بررسی شد. بررسی نتایج وجود برخی روابط بین ساختمان و فعالیت مشتقات را آشکار می‌کند. ترکیبات N3, N2, N1 مشتق شده از نورفلوکساسین، C3, C2, C1 مشتق شده از سیپروفلوکساسین و E3, E2, E1 مشتق شده از انوکساسین، در بین مشتقات مطالعه شده بیشترین فعالیت را با کمترین میانگین‌های IC50 نشان دادند. تغییری در سمیت سلولی به دنبال جایگزینی گروه سیکلوپروپیل متصل به N1 (ترکیبات C3, C2, C1) با گروه

استخلاف در موقعیت کربن شماره هفت مرتبط است (۱۹). رده سلولی ACHN (آدنو کارسینومای کلیه انسان) بیشترین مقاومت را در برابر تعدادی از مشتقات نشان داد. هماهنگ با نتایج این مطالعه، مقاومت ذاتی سلولهای ACHN به تعدادی از داروهای ضد توموری نظیر وین کریستین و

از غشاء سلول مرتبط دانسته‌اند، به ترتیبی که مولکول‌هایی که از قابلیت نفوذ بیشتر در رده سلولی Caco-2 برخوردار بوده‌اند سمیت سلولی بالاتری را نیز عرضه کرده‌اند (۱۵). گروه دیگری از محققین بر این باورند که توانایی نفوذ مولکول کینولون به درون سلول باکتری با ماهیت

جدول ۱: هسته (ساختمان) اصلی کینولونی و ساختمان‌های مشتقات سنتز شده

Compound	Ar	Z	X	R
N1		O	C	ethyl
N2		NOH	C	ethyl
N3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	ethyl
N4		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	ethyl
N5		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	ethyl
N6		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	ethyl
N7		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	ethyl
C1		O	C	cyclopropyl
C2		NOH	C	cyclopropyl
C3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	cyclopropyl
C4		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	cyclopropyl
C5		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	cyclopropyl
C6		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	C	cyclopropyl
E1		O	N	ethyl
E2		NOH	N	ethyl
E3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ -	N	ethyl



به دلیل دفع کلیوی و غلظت بالا در ادرار جهت درمان بهتر تو موهرهای کلیه و مثانه مطرح شده‌اند (۲۰۲۲، ۱۲، ۴). هم‌چنین اخیراً شواهدی مبنی بر اثر سینرژیک سیپروفلوکساسین و دوکسورویسین در کشت سلول‌های بدخیم سیستم ادراری منتشر شده است (۱۱). شواهد فوق به انضمام نتایج مطالعه حاضر احتمال اثرات ضد تو موری این گروه از ترکیبات کینولون را مطرح کرده و انجام مطالعات تکمیلی با استفاده از مدل‌های مناسب حیوانات آزمایشگاهی را پیشنهاد می‌کند.

آدریامایسین گزارش شده و دلیل مقاومت بیان گلیکوپروتئین P عنوان شده است (۱۳، ۱۴، ۱۸، ۲۷). بنابر این در مطالعه حاضر احتمالاً قابلیت نفوذپذیری، تمایل به جایگاه هدف و ژنتیک سلول در فعالیت مشتقات کینولون نقش دارد.

علی‌رغم مقاومت سلول‌های ACHN نسبت به برخی از مشتقات، سلول‌های فوق همانند رده سلولی EI (کارسینوما می مثانه انسان)، حساسیت قابل توجهی به مشتقات واجد گروه بروموتینیل و N7 نشان دادند. آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون

جدول ۲: سمیت سلولی مشتقات کینولون بر شش رده سلولی بدخیم

Mean **	A549	HEPG-2	SKMEL-3	REYF-1	EJ	ACHN	رده سلولی ترکیب
۲/۹	۳/۲	۲/۶	۳/۲	۲/۸	۲/۸	۲/۹ *	N1
۲/۳	۲/۵	۱/۷	۲/۶	۲/۶	۱/۸	۲/۶	N2
۲/۵	۲/۱	۲/۷	۲/۷	۲/۴	۲/۶	۲/۷	N3
۲۶/۲	۱۳/۲	۲۰/۷	۳۵/۸	۷/۷	۳۱/۸	۴۸	N4
۶/۲	۶/۲	۱/۶	۴/۳	۱/۴	۶/۵	۱۷/۳	N5
۱۲/۶	۸	۱/۴	۷	۱/۴	۱۷/۸	۴۰/۵	N6
۴/۴	۵/۷	۲/۷	۷	۴	۴/۷	۲/۴	N7
۳	۲/۴	۲/۹	۳/۵	۳/۳	۳/۱	۳/۵	C1
۲/۴	۲/۸	۱/۷	۲/۵	۲/۵	۲/۶	۲/۴	C2
۲/۹	۲/۵	۳/۱	۳/۵	۲/۷	۲/۹	۲/۸	C3
۳۵/۶	۳۶	۲۴/۶	۳۳/۶	۲۵/۸	۴۵/۶	۴۸/۴	C4
۲۱/۵	۸/۶	۱۵/۹	۶	۲۳	۱۹/۶	۵۶/۲	C5
۱۱/۵	۴/۴	۳/۸	۶	۱۰/۷	۱۰/۲	۳۴	C6
۳	۲/۷	۲/۵	۲/۵	۳/۱	۳/۲	۳/۸	E1
۲/۵	۱/۴	۲/۸	۳/۳	۲/۵	۲/۷	۲/۶	E2
۲/۹	۲/۶	۲/۵	۳/۶	۳/۴	۲/۸	۲/۸	E3
۱/۷	۱/۷	۲/۱	۱/۸	۱/۶	۱/۶	۱/۸	Etoposide

سلول‌ها به مدت سه روز با رقت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیبات کینولون مجاور شدند، سپس فعالیت متابولیکی سلول با روش MTT assay سنجش شد.
* = غلظت کینولون (میکروگرم در میلی‌لیتر) که رشد سلول را ۵۰ درصد نسبت به کنترل کاهش می‌دهد.
** = میانگین IC50های شش رده سلولی مربوط به هر مشتق کینولون

تشکر و قدردانی

پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان است. لذا بدین وسیله از آن معاونت تشکر می‌شود.

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی شماره ۸۴/۳۶ مصوب معاونت

Summary

In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Sixteen New N-Piperazinyl Quinolone Derivatives Against A Panel Of Tumor Cell Lines

Rajabalian S., MSc.¹, Foroumadi A.R., Ph.D.², Heidari M.R. Ph.D.³, Karimzadeh R., Pharm.D.⁴, Pardakhti A., Ph.D.⁵, Hosseini R., B.Sc.¹

1. Researcher, Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. Associate Professor of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 3. Professor of Pharmacology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 4. Pharmacist 5. Assistant Professor of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Technology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Introduction: Fluoroquinolones are potent inhibitors of bacterial topoisomerase II. They can also inhibit eukaryotic topoisomerase, and may confer antitumoral properties.

Method: In this study the antitumoral activity of a new series of N-substituted piperazinyl-fluoroquinolones against a panel of human tumor cell lines was determined by MTT assays.

Results: Among the tested compounds N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-oxoethyl] (C1,N1,E1), N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-(hydroxyimino) ethyl] (C2,N2,E2) and N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-(phenylmethoxyimino) ethyl] (C3,N3,E3) piperazinyl quinolones exhibited the most cytotoxic activities (mean IC50s = 2.5 to 3 µg/ml), comparable to that of the Etoposide (mean IC50= 1.7µg/ml). Replacement of the 5-bromo-2-thienyl with 4-fluorophenyl or 2,6-difluorophenyl rings leads to variable inhibition activity. The quinolone activity was enhanced by the presence of a chlorine and two fluorine atoms at the benzyl and phenyl groups, especially against ACHN renal adenocarcinoma cell line.

Conclusion: These data suggest that these series of quinolones provide good models for the further design of potent antitumor compounds.

Key words: Cytotoxicity, Fluoroquinolone, MTT- assay, Etoposide

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 100-108.

References

1. Arakawa H, Mano E, Hakoda N, Yoshinari T, Nakagawa S, Okura A. Potent antitumor activity of quinolone compounds with an unsaturated aminoazabicyclo group at the C-7 position of the quinolone ring. *Anticancer Drug Des* 1996; 11(3): 221-9.
2. Aranha O, Wood DP Jr, Sarkar FH. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 891-900.
3. Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL, Hutt MP, Mich TF, Sanchez JP, Solomon M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target

- enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J Med Chem* 1986; 29(3): 394-404.
4. Ebisuno S, Inagaki T, Kohjimoto Y, Ohkawa T. The cytotoxic effect of floxacine and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma *in vitro*. *Cancer* 1997; 80(12): 2263-7.
 5. Elsea SH, McGuirk PR, Gootz TD, Moynihan M, Osheroff N. Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage *in vitro* and cytotoxic potential. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(10): 2179-86.
 6. Fang KC, Chen YL, Sheu JY, Wang TC, Tzeng CC. Synthesis, antibacterial, and cytotoxic evaluation of certain 7-substituted norfloxacin derivatives. *J Med Chem* 2000; 43(20): 3809-12.
 7. Foroumadi A, Soltani F, Mirzaei M. Antituberculosis agents IV: *in vitro* antimycobacterial activity and cytotoxicity of N-piperazinyl quinolone derivatives containing 2-thienyl and 2-furyl moiety. *Pharmazie* 2003; 58(5): 347-8.
 8. Foroumadi A, Soltani F, Asadipour A. Antituberculosis agents. VII. Synthesis and *in vitro* evaluation of antimycobacterial activity and cytotoxicity of some N-piperazinyl quinolone derivatives. *Boll Chim Farm* 2003; 142(3): 130-4.
 9. Gootz TD, Barrett JF, Sutcliffe JA. Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on eukaryotic topoisomerases and related test systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(1): 8-12.
 10. Hussy P, Maass B, Tummler B, Grosse F, Schomburg U. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29(6): 1073-1078.
 11. Kamat AM, DeHaven JI, Lamm DL. Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. *Urology* 1999; 54(1): 56-61.
 12. Kamat AM, Lamm DL. Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology* 2004; 63(3): 457-60.
 13. Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, Yamada S, Okano M, Kawada Y. Detection of low-level expression of P-glycoprotein in ACHN renal adenocarcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(5): 475-9.
 14. Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, Yamada S, Okano M, Kawada Y. Correlation of expression levels of P-glycoprotein with resistance to adriamycin in a renal adenocarcinoma cell line. *Urol Res* 1997; 25(6): 407-12.
 15. Kim JS, Rhee HK, Park HJ, Lee IK, Lee SK, Suh ME, Lee HJ, Ryu CK and Choo HY. Synthesis of 6-chloroisoquinoline-5,8-diones and pyrido[3,4-*b*]phenazine-5,12-diones and evaluation of their cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory activity. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(1): 451-7.
 16. Liu L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 351-75.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 18. Nygren P, Larsson R. Differential *in vitro* sensitivity of human tumor and normal cells to chemotherapeutic agents and resistance modulators. *Int J Cancer* 1991; 48(4): 598-604.
 19. Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 3:S180-6.
 20. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan M, Sutcliffe JA, Osheroff N. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-

- mediated DNA cleavage. *J Biol Chem* 1991; 266(22): 14585-92.
21. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuiirk PR, Osheroff N. Effects of novel fluoroquinolones on the catalytic activities of eukaryotic topoisomerase II: Influence of the C-8 fluorine group. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(4): 751-6.
 22. Seay TM, Peretsman SJ, Dixon PS. Inhibition of human transitional cell carcinoma *in vitro* proliferation by fluoroquinolone antibiotics. *J Urol* 1996; 155(2): 757-62.
 23. Suto MJ, Domagala JM, Roland GE, Mailloux GB, Cohen MA. Fluoroquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity. *J Med Chem* 1992; 35(25): 4745-50.
 24. Vosberg H.D. DNA topoisomerase: enzymes that control DNA conformations. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985, 114: 19-102.
 25. Wentland MP, Leshner GY, Reuman M, Gruett MD, Singh B, Aldous SC, et al. Mammalian topoisomerase II inhibitory activity of 1-cyclopropyl -6,8-difluoro -1,4-dihydro-7-(2,6-dimethyl-4-pyridinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid and related derivatives. *J Med Chem* 1993; 36(10): 2801-9.
 26. Xia Y, Yang ZY, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the discovery and development of quinolones and analogs as antitumor agents. *Curr Med Chem* 1999; 6(3): 179-94.
 27. Yu DS, Chang SY, Ma CP. The expression of *mdr-1*-related *gp-170* and its correlation with anthracycline resistance in renal cell carcinoma cell lines and multidrug-resistant sublines. *Br J Urol* 1998; 82(4): 544-7.
 28. Yamashita Y, Ashizawa T, Morimoto M, Hosomi J, Nakano H. Antitumor quinolones with mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage activity. *Cancer Res* 1992; 52(10): 2818-22.
 29. Zweerink MM, Edison A. Inhibition of *Micrococcus luteus* DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29(4): 598-601