مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۱ /هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۵

پتانسیل ترمیم آسیب القا شده به DNA در سلول‌های MCF-7 به دنبال تماس با مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران با خواص مهار آروماتاز

دکتر محمود اعتباری[۱]، دکتر قدمعلی خدارحمی[۲]، دکتر عباس جعفریان دهکردی[۳]، زری نخودیان[۴]

چکیده

مقدمه: مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران با مهار آنزیم آروماتاز تولید استروژن‌های آندوژن را محدود می‌کنند. بررسی اثرات سیتوتوکسیک این ترکیبات وجود مکانیسم‌هایی همچون آسیب به DNA را مطرح می‌نماید. بنابراین مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی توان ترمیم به دنبال آسیب به DNA طراحی گردید.

روش‌ها: سلول‌های MCF-7 توسط غلظت‌های متفاوت مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران به مدت ۲ ساعت تیمار و سمیت ژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. قدرت ترمیم DNA با انکوبه کردن سلول‌ها با محیط کشت تازه به مدت ۱۷ و ۲۴ ساعت پس از قطع مواجهه‌ی ۲ ساعته با غلظت القا کننده‌ی آسیب ژنتیکی، توسط تست Comet قلیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های One way ANOVA و Tukey استفاده شد و $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: سمیت ژنتیکی ایجاد شده توسط مشتق ۴-فلورو، ۴-کلرو، ۲-متوکسی، ۲-متیل و مشتق بدون استخلاف بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول به ترتیب در غلظت‌های ۷۰، ۷۵، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ نانومول مشاهده گردید. DNA آسیب دیده توسط استخلاف ۴-کلرو، ۴-فلورو و ۲-متیل پس از ۲۴ ساعت و مشتق بدون استخلاف و ۲-متوکسی پس از گذشت ۱۷ ساعت ریکاوری شدند.

نتیجه‌گیری: بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول و مشتقات ۴-فلورو، ۴-کلرو، ۲-متوکسی و ۲-متیل آن ژنوتوکسیک هستند، اما آسیب وارده به گونه‌ایی است که سلول قادر به ترمیم DNA خود می‌باشد. این ترکیبات می‌توانند توسط سایر تست‌های مربوط دنبال شوند تا در صورت ارزیابی مثبت بتوان از خاصیت درمانی آن‌ها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران، آسیب DNA، ترمیم DNA، Comet قلیایی

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های مشاهده شده در خانم‌ها است و مهم‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در آن‌ها می‌باشد (۲-۱). شواهد مختلفی مبنی بر نقش استروژن در آغاز و پیش‌برد سرطان پستان وجود دارد (۴-۳). مخالفت با اثرات استروژن یکی از راه‌های کاهش خطر بروز این نوع از سرطان است. ترکیبات آنتی‌استروژن با جلوگیری از اتصال استروژن به گیرنده‌ی خود و مهارکننده‌های سنتز استروژن می‌توانند با جلوگیری از سنتز استروژن در این راستا کمک کننده باشند (۵).

مهارکننده‌های آنزیم آروماتاز با بلوک کردن تبدیل آندروستن‌دیون و تستوسترون به استروژن‌ها (۶)، در زنان یائسه‌ی مبتلا به سرطان پستان با استروژن رسپتور مثبت (ER+)، جهت کاهش سطح استروژن بافت پستان و پلاسما مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸-۷). از

[۱] استادیار، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشیار، گروه شیمی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استاد، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: زری نخودیان
Email: nokhodian@idrc.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir

دو دهه‌ی قبل تاکنون، این مهارکننده‌ها نه تنها در درمان سرطان پستان پیشرفته، بلکه در جهت درمان کمکی سرطان پستان اولیه نیز مطرح می‌باشند (۱۰-۹، ۷). مشتقات بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول کلاس جدیدی از مهارکننده‌های آروماتاز قوی هستند که از طریق زوج الکترون نیتروژن حلقه‌ی ایمیدازول به Fe^{3+} گروه هِم در محل فعال آنزیم متصل می‌شوند (۱۱). تحقیقات نشان می‌دهد مشتقات بنزوفوران نسبت به آمینوگلوتتمید از قدرت بیشتری در مهار آنزیم برخوردار هستند (۱۲).

پژوهش‌ها حکایت از اثر سیتوتوکسیک این ترکیبات بر روی رده‌های سلول آروماتاز منفی و مثبت دارد (۱۳) که نمایانگر وجود مکانیسم‌های دیگری، غیر از مهار آنزیمی، همچون آسیب به DNA می‌باشد.

سلول‌های پستانداران با استرس‌های ژنوتوکسیک متعددی مواجه می‌شوند (۱۴). ترمیم DNA، آپپتوز و فعال‌سازی ژن‌های پاسخ‌گو در توقف سیکل سلولی، از جمله پاسخ‌های پیچیده‌ی سلول‌های پستانداران نسبت به آسیب وارده به DNA می‌باشد (۱۵). در این میان سیستم ترمیم DNA از اهمیت خاصی در محافظت از ژنوم در مقابل آسیب‌های وارده ایفا می‌نماید؛ به طوری که در صورت عدم فعالیت ژن‌های ترمیم کننده‌ی DNA و عدم ترمیم DNA آسیب دیده احتمال بروز موتاسیون و سرطان‌زایی بیشتر خواهد شد (۱۴).

با وجود امکان آسیب به DNA در مورد این ترکیبات، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص ژنوتوکسیسیتی و امکان ترمیم در آن‌ها صورت نگرفته است. بنابراین پژوهش حاضر به بررسی پتانسیل ترمیم آسیب القا شده به DNA در سلول‌های MCF-7 به دنبال تماس با مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران با خواص مهار آروماتاز طراحی گردید.

روش‌ها

کشت سلولی: رده‌ی سلولی MCF-7 خریداری شده از بانک سلولی از انستیتو پاستور ایران در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ کامل حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و ۲۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک‌های پنیسیلین/استرپتومایسین (۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در انکوباتور CO_2 با شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد.

رده‌ی سلولی MCF-7 یک مدل استاندارد برای مطالعات سرطان پستان در محیط برون تن محسوب می‌شود که به صورت چسبیده به کف فلاسک رشد می‌نماید و منشأ آن آدنوکارسینومای پستان است. در صورتی که تراکم سلولی در فلاسک به ۸۰ درصد می‌رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. برای این کار در شرایط آسپتیک کامل و در زیر هود لامینار محیط کشت فلاسک تخلیه گردید و سلول‌ها با فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) شستشو داده شدند. سپس با افزودن۲ میلی‌لیتر تریپسین ۲۵/ درصد و انکوبه کردن به مدت ۵ دقیقه از کف فلاسک جدا شدند. جهت خنثی کردن تریپسین، ۴ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به فلاسک اضافه گردید. بعد از پیپتاژ کردن، محتوی فلاسک به یک فالکن استریل منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۸۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

محیط کشت در جهت شیب غلظت جدا و محیط کشت جدید به سلول‌ها اضافه شد و با انجام ورتکس یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت تهیه گردید. این سوسپانسیون سلولی بین فلاسک‌های جدید توزیع شد

www.mui.ac.ir

و فلاسک‌ها با درج مشخصات و تاریخ دوباره در انکوباتور CO_2 قرار داده شدند.

آماده‌سازی نمونه: مشتقات بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول شامل مشتقات ۴-فلورو، ۴-کلرو، ۲-متوکسی، ۲-متیل و مشتق بدون استخلاف آن تهیه شده در گروه شیمی‌دارویی دانشکده‌ی داروسازی اصفهان در حلال ۱۰ درصد دی متیل سولفوکساید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) حل شدند و پس از افزودن محیط کشت محلولی با غلظت ۱ میلی‌مول تهیه گردید. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه زیر نور ماورای بنفش (Ultra violet یا UV) استریل شد و سپس در شرایط دور از نور در یخچال نگهداری گردید. قبل از انجام آزمایش ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و محلول با غلظت ۱۰۰ میکرومول تهیه گردید. این کار برای تهیه‌ی محلول با غلظت ۱۰ میکرومول دوباره انجام گرفت.

تیمار کردن سلول‌ها با داروهای مورد بررسی: سلول‌ها پس از رشد در فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مکعب جهت تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی یکنواخت مورد استفاده قرار گرفت (شستشو با PBS، تریپسینه کردن، انکوبه شدن، خنثی‌سازی، سانتریفوژ، جدا کردن سلول‌ها، افزایش محیط کشت جدید).

تعداد سلول‌های مناسب جهت این آزمایش $۱۰^۵$-$۱۰^۶$ سلول بود. در صورتی که تعداد سلول‌ها مناسب بود با دارو تیمار می‌گردید؛ بدین منظور سوسپانسیون سلولی با نسبت ۱، محیط کشت با نسبت ۲ و دارو با احتساب حجم کل ۳ میلی‌لیتر به چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه افزوده گردید. یک چاهک شاهد و یک چاهک شاهد حلال نیز در نظر گرفته شد (چاهک شاهد حلال حاوی DMSO در بالاترین غلظت مورد مطالعه بود). محتوی چاهک‌ها پیپتاژ شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفت تا سلول‌ها با دارو مواجه شوند. پس از این زمان محتوی چاهک‌ها تخلیه گردید و ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین به چاهک اضافه و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از جدا شدن سلول‌ها از کف، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به چاهک‌ها اضافه شد و پیپتاژ انجام گرفت و محتوی چاهک به فالکن منتقل گردید. فالکن به مدت ۵ دقیقه روی ۱۸۰۰ دور سانتریفوژ شد و محیط کشت اضافی در جهت شیب غلظت تخلیه گردید. ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت به فالکن‌ها اضافه شد و جهت آزمایش Comet مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

یک روش مفید برای بررسی آسیب DNA، SCG (Single-cell gel) و یا Comet assay می‌باشد. Comet یا ستاره‌ی دنباله‌دار در حقیقت بیان‌گر الگوی مهاجرت DNA سلول منفرد است.

آزمایش کامت قلیایی (Comet assay): سوسپانسیون سلولی با آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین (LMA ۱ درصد) به نسبت یک به دو مخلوط و به روی اسلایدهای پوشش داده شده با آگارز با نقطه‌ی ذوب طبیعی (NMA ۱ درصد) قرار داده شدند. سپس جهت ایجاد یک لایه‌ی سلول به روی هر اسلاید یک لامل قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه اسلایدها درون یخچال نگهداری گردید.

پس از خارج کردن اسلایدها از یخچال، لامل آن‌ها برداشته شد و تمامی اسلایدها به غیر از شاهد مثبت در مکانی سرد و بدون نور نگهداری شد. به عنوان شاهد مثبت محلول ۲۰۰ میکرومول H_2O_2 به مدت ۱۷ دقیقه به روی لام مثبت ریخته شد و سپس سه نوبت شستشو با آب دیونیزه در طی ۱۵ دقیقه انجام گرفت.

www.mui.ac.ir

پس از آن تمامی اسلایدها در بافر لیز کننده‌ی سرد و تازه (۲/۵ مول NaCl، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA، ۱۰ میلی‌مول Tris، ۰/۲ مول NaOH، ۱ درصد Triton x- ۱۰۰ و PH = ۱۰) غوطه‌ور شدند و به مدت ۴۵ دقیقه درون یخچال قرار داده شدند. اسلایدها ۲۰ دقیقه و در ۲ نوبت شسته شدند و پس از آن به منظور باز شدن DNA به مدت ۴۰ دقیقه درون بافر الکتروفورز سرد و تازه (۱ میلی‌مول EDTA، ۰/۳ مول NaOH و PH > ۱۳) درون یخچال نگهداری شدند. اسلایدها از محلول خارج شدند و درون تانک الکتروفورز حاوی بافر قرار گرفتند و به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۲۵ و ۳۰۰ میلی‌آمپر قرار داده شدند. به منظور خنثی سازی محیط بازی، بافر خنثی کننده (۰/۴ مول Tris و PH = ۷/۵) به مدت ۱۰ دقیقه با اسلایدها در تماس قرار گرفت. جهت رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با مدت زمان ۷ دقیقه استفاده گردید. بعد از آن اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه با آب دیونیزه شسته شدند و پس از خشک شدن با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میکروسکوپ فلورسنت جهت مشاهده‌ی Comet مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای هر نمونه دو اسلاید، سه مرتبه تکرار و از حداقل صد سلول عکس گرفته شد.

تجزیه و تحلیل تصاویر توسط نرم‌افزار Comet score انجام گردید. میانگین سه شاخص TM (Tail moment)، درصد DNA در دم و طول دم توسط نرم‌افزار SigmaStat و با استفاده از روش آنالیز One way ANOVA و آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شد و P < ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید (۱۶).

بررسی ترمیم DNA: سلول‌ها با غلظت ژنوتوکسیک ترکیب مورد مطالعه به مدت دو ساعت تیمار شدند. پس از خارج کردن پلیت از انکوباتور محیط رویی آن تخلیه و سلول‌ها با PBS به آرامی شسته شدند و ۳ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به هر چاهک اضافه گردید. پلیت‌ها برای مدت ۱۷ ساعت دوباره به انکوباتور بازگردانده شدند. پس از طی این زمان، پلیت از انکوباتور خارج گردید و مراحل تخلیه‌ی محیط کشت، افزایش تریپسین، انکوبه شدن، خنثی نمودن، سانتریفوژ، برداشتن محیط رویی و افزایش محیط کشت جهت انجام آزمایش Comet مشابه قبل انجام گرفت. میزان ترمیم در ۲۴ ساعت نیز ارزیابی شد (۱۶).

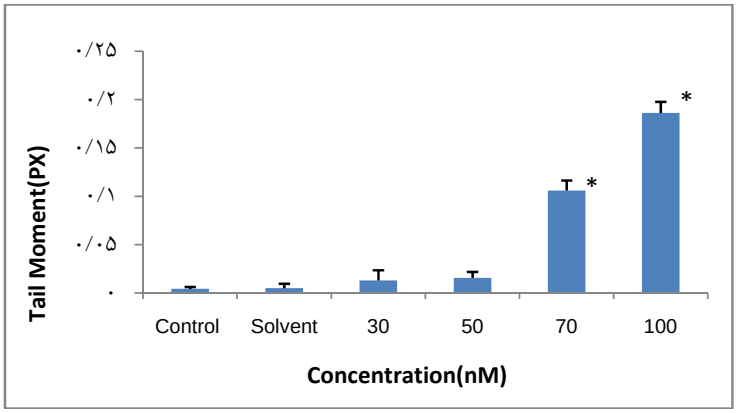
یافته‌ها

آسیب وارده به DNA سلول‌های MCF-7 پس از ۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های متفاوتی از مشتقات ۴-فلورو، ۴-کلرو، ۲-متوکسی، ۲-متیل و مشتق بدون استخلاف بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول توسط سه پارامتر درصد DNA در دم، طول دم و Tail moment مورد ارزیابی قرار گرفت. از آن جایی که Tail Moment در بر گیرنده‌ی دو پارامتر دیگر است و بر اساس دیگر مطالعات از ارزش بیشتری برخوردار می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. نتایج در اشکال ۵-۱ در قالب این شاخص ارائه شده است.

شکل ۶ قدرت ترمیم DNA و میزان آن را در قالب پارامتر TM پس از قطع مواجهه‌ی ۲ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های ژنوتوکسیک ترکیبات مورد مطالعه در زمان‌های ۱۷ و ۲۴ ساعت نشان می‌دهد.

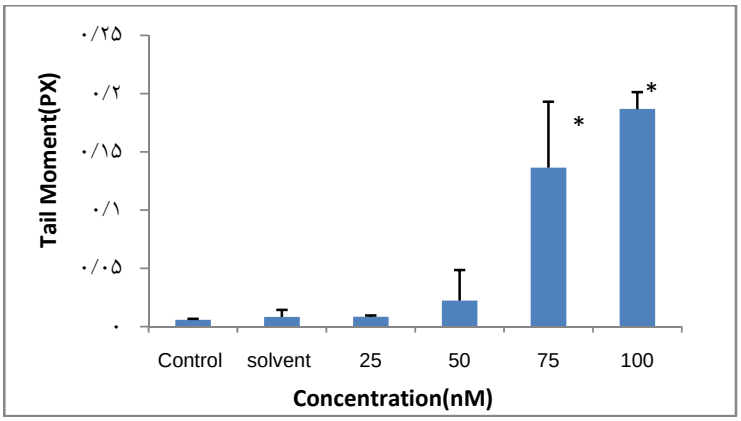
تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های ۱۰۰، ۷۰، ۵۰ و ۳۰ نانومول مشتق ۴-فلورو بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول منجر به آسیب ژنتیکی نسبت به شاهد منفی

www.mui.ac.ir



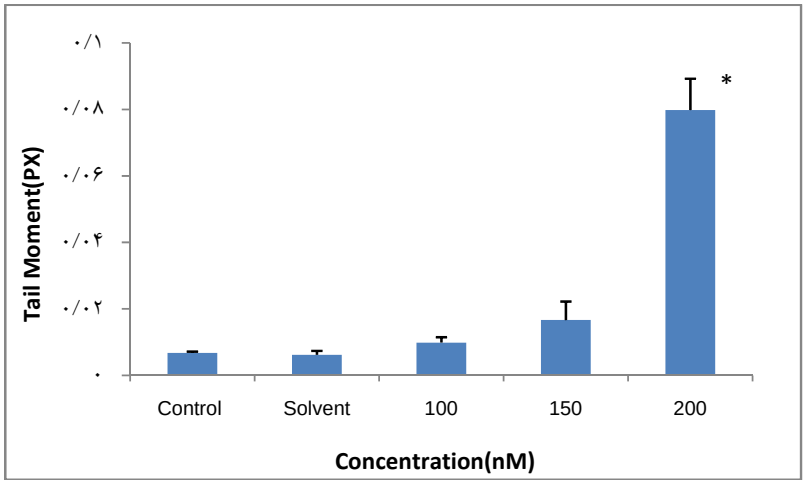
شکل ۱. آسیب به DNA توسط مشتق ۴-فلوروبنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در رده‌ی سلولی MCF-7

***: P < ۰/۰۵ در مقایسه با شاهد منفی**



شکل ۲. آسیب به DNA توسط مشتق ۴-کلرو بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در رده‌ی سلولی MCF-7

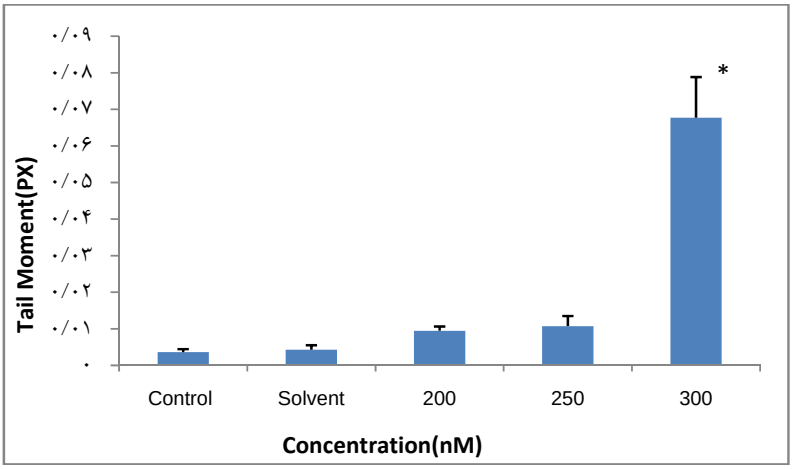
***: P < ۰/۰۵ در مقایسه با شاهد منفی**



شکل ۳. آسیب به DNA توسط مشتق ۲- متوکسی بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در رده‌ی سلولیMCF-7

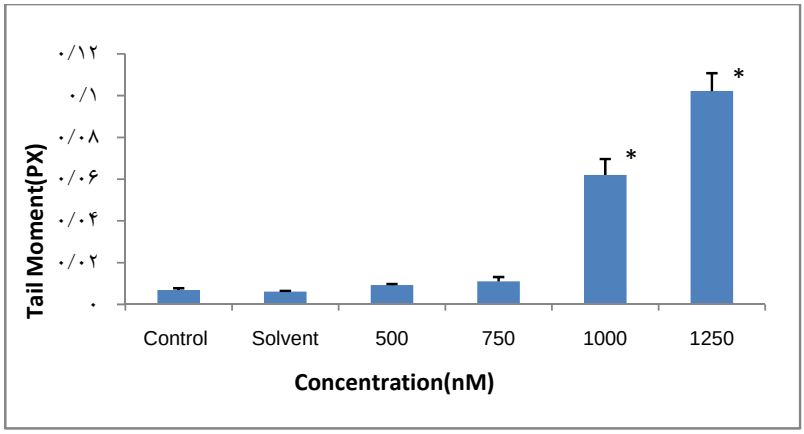
***: P < ۰/۰۵ در مقایسه با شاهد منفی**

www.mui.ac.ir



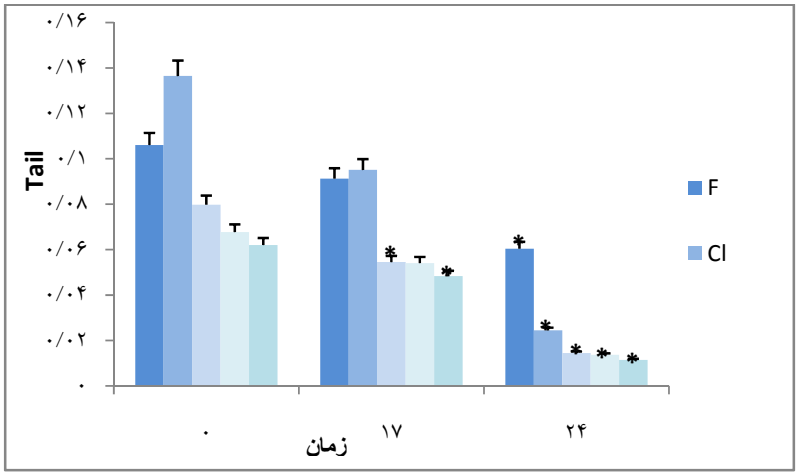
شکل ۴. آسیب به **DNA** توسط مشتق ۲-متیل بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در رده‌ی سلولی **MCF-7**

*: $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با شاهد منفی



شکل ۵. آسیب به **DNA** توسط مشتق بدون استخلاف بنزوفوران فنیل پمتیل ایمیدازول در رده‌ی سلولی **MCF-7**

*: $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با شاهد منفی



شکل ۶. ترمیم آسیب ایجاد شده توسط مشتقات استخلاف شده‌ی بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در رده‌ی سلولی **MCF-7**

*: $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با زمان صفر

www.mui.ac.ir

در غلظت ۷۰ نانومول گردید.

TM این غلظت نسبت به غلظت ۱۰۰ نانومول با $P < ۰/۰۰۱$، اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱). ترمیم و ریکاوری ۱۷ ساعته متعاقب قطع مواجهه‌ی ۲ ساعته سلول‌ها با غلظت ۷۰ نانومول این ترکیب، اختلاف آماری معنی‌داری را نسبت به زمان قطع مواجهه بیان نمی‌کند. ریکاوری ۲۴ ساعته ($P < ۰/۰۲$) با ترمیم DNA سلول همراه بود. TM زمان ۲۴ ساعت ریکاوری نسبت به زمان ۱۷ ساعت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۶).

در میان غلظت‌های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ نانومول مطالعه شده، غلظت ۷۵ نانومول مشتق ۴-کلر بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول قادر به القای آسیب به DNA رده‌ی سلولی مورد مطالعه نسبت به شاهد منفی بود؛ اگر چه TM غلظت ۱۰۰ نانومول این ترکیب نسبت به غلظت ۷۵ نانومول افزایش نشان داد، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲). با وجود عدم ترمیم DNA پس از انجام ریکاوری ۱۷ ساعته، ریکاوری ۲۴ ساعته با ترمیم DNA توأم بود ($P < ۰/۰۱$). TM در فاصله‌ی زمانی ۱۷ و ۲۴ ساعت تفاوتی را نشان نداد (شکل ۶).

مشتق ۲-متوکسی بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰ و ۱۰۰ نانومول مورد بررسی قرار گرفت و غلظت ۲۰۰ نانومول نسبت به شاهد منفی دارای آسیب بیشتری بود (شکل ۳). سلول‌های MCF-7 پس از قطع مواجهه طی زمان‌های ۱۷ و ۲۴ ساعت به ترتیب با P مساوی ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ قادر به ترمیم DNA خود بودند و کاهش TM ۲۴ ساعته نسبت به ۱۷ ساعت نیز با $P < ۰/۰۰۱$ معنی‌دار بود (شکل ۶).

غلظت ۳۰۰ نانومول مشتق ۲ متیل بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول پس از بررسی غلظت‌های ۳۰۰، ۲۵۰ و ۲۰۰ نانومول نسبت به شاهد منفی آسیب معنی‌داری به DNA سلول را نشان داد (شکل ۴)؛ اگر چه ریکاوری ۱۷ ساعته قادر به ترمیم آسیب نبود، اما گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع مواجهه، بازیابی DNA را با $P < ۰/۰۰۱$ امکان‌پذیر نمود. کاهش معنی‌دار TM در ریکاوری ۲۴ ساعته نسبت به ۱۷ ساعت با $P < ۰/۰۰۲$ ملاحظه شد (شکل ۶).

تیمار سلول‌های MCF-7 با محدوده‌ای از غلظت‌های ۱۲۵۰-۵۰۰ نانومول مشتق بدون استخلاف بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول سبب افزایش معنی‌دار TM در غلظت ۱۰۰۰ نانومول نسبت به شاهد منفی گردید. غلظت ۱۰۰۰ نانومول نسبت به غلظت ۱۲۵۰ نانومول با $P < ۰/۰۰۱$ آسیب کمتری را به DNA وارد نمود (شکل ۵). گذشت زمان ۱۷ ساعت با $P < ۰/۰۳$ و زمان ۲۴ ساعت با $P < ۰/۰۰۱$ با ترمیم DNA همراه بود. TM در فاصله‌ی زمانی ۱۷ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) را نشان داد (شکل ۶).

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش بیان‌گر سمیت ژنتیکی مشتقات بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول در مقیاس $۱۰^{-۶}$-$۱۰^{-۸}$ مولار بود. اثر سایتوتوکسیک این ترکیبات به روی رده‌ی سلولی MCF-7 و Hela توسط خدارحمی و همکاران (۱۳) و اثر مهارکنندگی آن‌ها به روی آنزیم آروماتاز تخلیص شده توسط Whomsley و همکاران (۱۷) مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

اثر سایتوتوکسیک این مشتقات بر روی یک رده‌ی

www.mui.ac.ir

جدول ۱. مقایسه‌ی فعالیت مهارکنندگی آروماتاز (۱۷)، سیتوتوکسیسیتی (۱۳) و ژنوتوکسیسیتی تعدادی از مشتقات بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول

مشتقات	مهارکنندگی آروماتاز (۱۷) $IC_{50\ nM}$	اثرات ژنوتوکسیسیتی nM	اثرات سیتوتوکسیسیتی (۱۳) $IC_{50\mu M}$ On MCF-7	On HELA
B.P.M.I *	۴۳/۲	۱۰۰۰	۸۰	۸۰
4-F B.P.M.I	۷/۳	۷۰	۳۹	۷۴
4-Cl B.P.M.I	۷/۷	۷۵	۳۵	۵۵
2-OCH_3 B.P.M.I	۱۹/۷	۲۰۰	۵۰	۸۵
2 CH_3 B.P.M.I	۷/۹	۳۰۰	۶۱	۶۵

* Benzofuran phenylmethyl imidazole

سلولی آروماتاز منفی همچون HeLa، اگر چه اندکی کمتر از اثر آن‌ها بر روی رده‌ی سلولی آروماتاز مثبت MCF-7 بود (۱۳)، اما القا کننده‌ی این فرضیه است که مکانیسم‌های دیگری به غیر از مهار آنزیم نیز مطرح می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، یکی از این مکانیسم‌ها می‌تواند آسیب وارده به DNA و اثر ژنوتوکسیک این مشتقات باشد.

اختلاف قابل ملاحظه بین غلظت مهار کنندگی آنزیم (۱۷)، به عنوان یک اثر درمانی، با غلظت‌های ژنوتوکسیک و سایتوتوکسیک (۱۳) این ترکیبات، که در جدول مشاهده می‌شود، آن‌ها را تبدیل به ترکیبات قابل توجهی برای مطالعات و پژوهش‌های آتی می‌نماید تا در صورت موفقیت در سپری نمودن سایر تست‌های سمیت بتوان از فواید درمانی آن‌ها بهره گرفت.

مسأله‌ی قابل تعمق دیگر در این خصوص، قدرت ترمیم DNA سلول پس از قطع مواجهه می‌باشد؛ اگر چه ترکیبات قوی‌تر نیاز به سپری نمودن زمان بیشتری جهت ترمیم دارند، اما قابلیت ترمیم در مورد همه‌ی آن‌ها وجود دارد.

سلول‌های MCF-7 به دنبال آسیب به DNA از یک سو به آسانی دچار آپپتوز نمی‌شوند (۱۸) و از سویی دیگر با دارا بودن ژن طبیعی و دست نخورده‌ی p53 قادر به کد نمودن فسفو پروتئینی می‌باشند که با توقف سیکل سلولی در مرحله‌ی G1 زمان کافی جهت ترمیم DNA قبل از ورود به مرحله‌ی S را مهیا می‌سازد (۲۰-۱۸). این ترمیم می‌تواند، توجیه مناسبی در جهت اختلاف فاحش غلظت ژنوتوکسیک با سایتوکسیک این ترکیبات به روی رده‌ی سلولی MCF-7 باشد.

این احتمال وجود دارد که با افزایش غلظت ترکیبات مورد مطالعه، آسیب وارده به DNA به گونه‌ای باشد که امکان ترمیم دیگر وجود نداشته باشد و یا با افزایش غلظت مکانیسم‌های دیگری به استثنای آسیب به DNA سبب مرگ سلولی شود که این موضوع می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات بعدی گردد.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر مشتق بدون استخلاف بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول دارای کمترین و ترکیبات ۴-فلورو و ۴-کلرو آن دارای بیشترین پتانسیل سمیت ژنتیکی می‌باشند که با مطالعات خدارحمی و همکاران به روی اثر سایتوتوکسیک (۱۳) و تحقیق Whomsley و همکاران (۱۷) بر روی قدرت مهار آنزیمی این ترکیبات هم‌خوانی دارد.

طراحی کامپیوتری ساختار مشتقات بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول و آنزیم آروماتاز حکایت از نقش سوبسترایی این مشتقات و قرارگرفتن آن‌ها در جایگاه

www.mui.ac.ir

فعال آنزیم دارد.

به نظر می‌رسد با جایگزینی هیدروژن با یک استخلاف حجیم‌تر، ترکیب بهتر بتواند در جایگاه فعال آنزیم قرار بگیرد و نسبت به مهار آن اقدام نماید. افزایش قدرت مهارکنندگی آنزیم آروماتاز با قرار گرفتن استخلاف در حلقه‌ی فنیلی توسط Vinh و همکاران نیز بررسی شده است (۱۱).

با مهار آنزیم و عدم تولید استروژن، رشد وابسته به استروژن سلول‌ها نیز مهار می‌شود و ممکن است از همین طریق اثر ژنوتوکسیک و سایتوتوکسیک قوی‌تر مشتقات دارای استخلاف ایجاد شده باشد.

با وجود الکترونگاتیویته‌ی بالای دو اتم کلر و فلور، به نظر می‌رسد قرار گرفتن آن‌ها به جای هیدروژن سبب افزایش توان اتصال و استحکام بالای ترکیب با جایگاه فعال آنزیم شده باشد و متعاقب مهار بهتر قدرت فزاینده‌ی این ترکیبات ظاهر شده باشد.

نتیجه‌گیری

با وجود سمیت ژنتیکی بنزوفوران فنیل متیل ایمیدازول و مشتقات ۴-فلورو، ۴-کلرو، ۲-متوکسی و ۲-متیل آن، آسیب وارده به گونه‌ایی است که سلول قادر به ترمیم DNA خود می‌باشد. فرایند ارزیابی سلامت و ایمنی این داروها می‌تواند توسط سایر آزمون‌های مربوط دنبال گردد تا در صورت ارزیابی مثبت بتوان از خاصیت درمانی آن‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۳۸۹۳۸۸ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مساعدت‌های معاون محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل آورند. همچنین از خانم مینا میریان کارشناس آزمایشگاه کشت سلولی تشکر می‌گردد.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Breast Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008: GLOBOCAN 2008 [Online]. 2010. [cited 2011 Feb 23]; Available from: http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp.
2. Pakseresht S, Ingle GK, Bahadur AK, Ramteke VK, Singh MM, Garg S, et al. Risk factors with breast cancer among women in Delhi. Indian J Cancer 2009; 46(2): 132-8.
3. Vankrunkelsven P, Kellen E, Lousbergh D, Cloes E, Op de BL, Faes C, et al. Reduction in hormone replacement therapy use and declining breast cancer incidence in the Belgian province of Limburg. Breast Cancer Res Treat 2009; 118(2): 425-32.
4. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2006; 102(1-5): 89-96.
5. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. N Engl J Med 2003; 348(24): 2431-42.
6. Hong Y, Chen S. Aromatase, estrone sulfatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: structure-function studies and inhibitor development. Mol Cell Endocrinol 2011; 340(2): 120-6.
7. Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol 2008; 9(1): 45-53.
8. Criscitiello C, Fumagalli D, Saini KS, Loi S. Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection. Onco Targets Ther 2011; 4: 1-11.
9. Miller WR. Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer. Semin Oncol 2003; 30(4 Suppl 14): 3-11.
10. Howell A. New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer. Trends Endocrinol Metab 2005; 16(9): 420-8.
11. Vinh TK, Ahmadi M, Delgado PO, Perez SF, Walters HM, Smith HJ, et al. 1-[(Benzofuran-2-yl) phenylmethyl]-triazoles and -tetrazoles -

www.mui.ac.ir

potent competitive inhibitors of aromatase. Bioorg Med Chem Lett 1999; 9(14): 2105-8.
12. Khodarahmi GA, Laughton CA, Smith HJ, Nicholls PJ. Enantioselectivity of some 1-[(benzofuran-2-yl) phenylmethyl] imidazoles as aromatase (P450AROM) inhibitors. J Enzyme Inhib 2001; 16(5): 401-16.
13. Khodarahmi GA, Hassanzadeh F, Jafarian A, Chiniforoosh AH, Hajseyedabutorabi A. Cytotoxic effects of some 1-[(benzofuran-2-yl)-phenylmethyl] imidazoles on MCF 7and Hella cell lines. Res Pharm Sci 2012; 2: 73-9.
14. Smith ML, Fornace AJ, Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. Mutat Res 1996; 340(2-3): 109-24.
15. Fan S, Smith ML, Rivet DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, et al. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. Cancer Res 1995; 55(8): 1649-54.
16. Yared E, McMillan TJ, Martin FL. Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. Mutagenesis 2002; 17(4): 345-52.
17. Whomsley R, Fernandez E, Nicholls PJ, Smith HJ, Lombardi P, Pestellini V. Substituted 1-[benzofuran-2-yl)-phenylmethyl]-imidazoles as potent inhibitors of aromatase in vitro and in female rats in vivo. J Steroid Biochem Mol Biol 1993; 44(4-6): 675-6.
18. Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 1994; 9(12): 3743-51.
19. Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. Mol Cell Biol 1994; 14(3): 1815-23.
20. Fan S, el-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, et al. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. Cancer Res 1994; 54(22): 5824-30.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29. No 151. 3rd week. October 2011 Received: 2.6.2011 Accepted: 27.8.2011

DNA Repair Capability of MCF-7 after Exposure to Substituted Benzofuran Derivatives with Aromatase Inhibitory Effects

Mahmoud Etebari PhD[1], Ghadam Ali Khodarahmi PhD[2], Abbas Jafarian Dehkordi PhD[3], Zari Nokhodian[4]

Abstract

Background: Benzofuran derivatives block the aromatase enzyme and reduce estrogen production. It was shown that although the cytotoxicity of these compounds could be in part due to the aromatase inhibition, DNA damage may also be involved. This study was designed to assess whether these derivatives can induce DNA damage, and to evaluate if such damage could be repaired.

Methods: MCF-7 cells were exposed to the compounds at different concentrations to find a concentration sufficient to induce DNA damage. Cells were exposed for 2 hours to genotoxic concentration of compounds and recovered for 17 and 24 hours. The comet assay was used to examine DNA damage. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test were used for statistical analysis at a significance level of $P < 0.05$.

Findings: The genotoxic effects of benzofuran derivatives were observed in 70, 75, and 200 nM for the 4-fluoro, 4-chloro, and 2-methoxy derivatives of benzofuran, respectively. The genotoxic concentration of 2-methyl derivatives and the unsubstituted derivatives of benzofuran were 300 and 1000 nM, respectively. The DNA damages caused by 4-fluoro, 4-chloro and 2-methyl derivatives of benzofuran recovered after 24 hours while those caused by 2-methoxy and unsubstituted derivatives of benzofuran recovered after 17 hours.

Conclusion: The benzofuran phenylmethyl imidazole and its 4-fluoro, 4-chloro, 2-methoxy, and 2-methyl derivatives are genotoxic. Moreover, our study showed that the DNA damages caused by these substances were repairable. Therefore, if these compounds are able to pass other safety and clinical tests, they could be used as new therapeutic compounds.

Keywords: Substituted benzofuran derivatives, DNA damage, DNA repair, Comet assay

[1] Assistant Professor, Department of Pharmacology And Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Medicinal Chemistry And Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Professor, Department of Pharmacology And Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] MSc Student, Student Research Committee, Department of Pharmacology And Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Zari Nokhodian BSc, Email**:** nokhodian@idrc.mui.ac.ir