بررسی اثرات ضد التهابی مشتق جدید تیازولیدینون در سلولهای RAW 264.7 تحریک شده با LPS

مهرناز رضایی[۱]، حسین غفوری[۲*]، لیلا جمالزاده[۲]، محمودرضا آقامعالی[۲] و اسداله محمدی[۳]

[۱]رشت، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، گروه زیست شناسی

[۲]رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۳]رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۵

چکیده

مطالعات قبلی نشان می‌دهند که تیازولیدینون و مشتقات آن دارای فعالیتهای بیولوژیکی بسیار جالب و متنوعی از جمله فعالیتهای آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی می‌باشند. در این مطالعه، اثر سمیت و مهاری مشتق ۵- (۲, ۴- بیس (۴- اتوکسی فنیل آزو)- ۳- هیدروکسی بنزیلیدین)- ۲, ۴ تیازولیدینون ($TZD\text{-}OCH_2CH_3$) بر بیان نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) تحریک شده با ۱ μg/ml لیپو پلی ساکارید در رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7 بررسی گردید. برای تخمین میزان زیستایی (viability) سلول از تست MTT با غلظتهای (۰-۳۰۰ μg/ml) استفاده شد که نتایج نشان داد ترکیب مذکور در غلظتهای بالاتر از ۵۰μg/ml اثر کشندگی دارد (IC_{50}=120 μg/ml). سپس اثر ($TZD\text{-}OCH_2CH_3$) در مهار تولید نیتریک اکسید بر روی رده سلولی مذکور تیمار شده با لیپو پلی ساکارید در غلظتهای۳۰ و ۶۰ μg/ml مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، ترکیب سنتز شده $TZD\text{-}OCH_2CH_3$ ضمن اینکه دارای اثر قابل توجهی بر تولید نیتریک اکسید (NO) در سلولهای RAW264.7 می‌باشد، اثر ضد التهابی قابل توجهی نیز دارد. بنابراین به نظر می‌رسد این ترکیب پتانسیل خوبی برای استفاده در کنترل بیماریهای مختلف التهابی داشته باشد.

واژه های کلیدی: تیازولیدینون، RAW264.7، ضد التهابی، نیتریک اکسید سنتاز القایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷، پست الکترونیکی: H.ghafoori@guilan.ac.ir

مقدمه

سرطان، رشد غیرطبیعی سلول است که منجر به تغییرات متعدد در فرآیندهای بیوشیمیایی و الگوی بیان ژنها و همچنین ایجاد تداخل در تعادل تکثیر و مرگ سلولی می‌شود. مطالعات نشان داده است که این بیماری دومین علت مرگ و میر در جهان، به خصوص در گروههای سنی بین ۴۹ تا ۷۹ سال می‌باشد (۱۸). طبق آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی، سالیانه ۱۴ میلیون نفر به سرطان مبتلا می‌شوند که ۸/۲ میلیون نفر از این افراد جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند و در دو دهه آینده آمار مبتلایان به سرطان به ۲۲ میلیون نفر در جهان خواهد رسید. بنابراین یکی از مهم ترین عوامل مرگ انسان به شمار می‌رود. شیوع گسترده سرطان که به دلیل افزایش رشد جمعیت و در کنار آن افزایش رفتارهای سرطان‌زا مانند استرس، دود ناشی از سیگار، ویروسها، باکتریها و بعضی فاکتورهای غذایی می باشد، باعث تغییرات ژنتیکی و در نتیجه تبدیل سلول طبیعی به سلول سرطانی می‌شود. سرطان می‌تواند به واسطه مکانیسمها و مسیرهای سیگنالینگ متفاوتی ایجاد شود (۶). یکی از مهم ترین

مکانیسمها، مسیرهای التهابی است. «التهاب یک فرآیند کلیدی در سیستم دفاعی میزبان است» (۱۱)، اما افزایش مدت زمان و از دست دادن قدرت کنترل آن باعث تغییر مسیرهای پیام رسانی و منجر به بروز برخی بیماریها از جمله سرطان و التهاب مزمن می‌شود. التهاب مزمن ممکن است به سبب عفونتهای باکتریایی، ویروسی، انگلی، اجزا و ذرات غیر قابل هضم، محرکهای بیوشیمیایی و سایر عوامل به وجود آید (۱۹). مطالعات زیادی در زمینه استفاده از ترکیبات سنتزی برای کنترل و غیر فعال کردن فاکتورهای درگیر در مسیرهای التهابی و سرطان صورت گرفته است (۵). مسیرهای التهابی به دو دسته وابسته به آراشیدونیک اسید و مستقل از آراشیدونیک اسید تقسیم می‌شوند. در مسیر وابسته به آراشیدونیک اسید، فسفولیپاز A_2، آنزیمی از گروه لیپازها، باعث آزاد شدن اسیدهای چرب مانند اسید آراشیدونیک از لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلول شده و مسیرهایی از جمله مسیر سیکلواکسیژناز را شامل می‌شود. اسید آراشیدونیک از طریق مسیر سیکلواکسیژناز (cox) متابولیزه شده و باعث تولید پروستاگلاندین (PG) می شود (۹). در مسیر مستقل از آراشیدونیک اسید، ترکیب نیتریک اکسید (NO) نقش بسیار مهمی ایفاء می کند. نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) یکی از سه آنزیم مهم تولیدکننده NO از آمینواسید L-آرژنین است (۷). نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد هیدروفوب، غیر آلی، تأثیرگذار و پیام رسان است که در شرایط مختلف فیزیولوژیکی (تنظیم فشار خون، ترمیم زخم، مکانیسمهای دفاعی میزبان) و پاتولوژیکی (التهاب، عفونت، بیماریهای نئوبلاستیک، دیابت) نقش دارد (۱۲). ژن iNOS در کروموزوم ۱۷ قرار دارد و iNOS موش و انسان ۸۰ درصد شباهت دارند. میزان بیان این آنزیم با بیماریهای بدخیم مانند سرطان پستان، پروستات، مثانه و روده ارتباط دارد (۱۲). علاوه بر iNOS، که در شرایط القایی سلول به عنوان مثال به‌واسطه آلودگی با عفونتهای باکتریایی باعث تولید نیتریک اکسید می‌شود، نیتریک اکسید سنتاز عصبی (nNOS) و نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در شرایط طبیعی سلول می‌توانند مقدار محدودی نیتریک اکسید تولید کند. اگر چه نقش iNOS در طی رشد تومورهای سرطانی بسیار پیچیده است و خیلی درک نشده است، اما تأثیر اساسی این آنزیم در سرطان، بر روی فرآیندهایی همچون رگزایی، متاستاز و آپاپتوز مشاهده می‌شود، به طوری که غلظتهای بالای NO مستقیما" اثر سمیت سلولی دارند و آپاپتوز را در سلولهای نئوبلاستی القاء می‌کنند (۱۲ و ۲۴)، بنابراین کنترل بیان و فعالیت این آنزیم بسیار مورد توجه می‌باشد. همچنین با توجه به ارتباط التهاب و سرطان وگسترش بی رویه آن، اثر مهارکنندگی ترکیبات طبیعی و سنتزی مختلف بر روی مسیرهای مختلف التهاب مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. از جمله ترکیبات سنتزی، ترکیبات هیدرازون و پیرازول و مشتقات آنها می باشند که اثر آنها بر روی مسیر وابسته به آراشیدونیک اسید بررسی شده و نتایج مهار کنندگی آنها به اثبات رسیده است (۱۵)، و یا ترکیب ۲و۳-تیازولیدین-۴-اُن و مشتقات دیگر آن که اثر مهار کنندگی قوی روی رده سلولی سرطان پستان دارند (۱۷). همچنین یکی دیگر از ترکیبات سنتزی که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است، ترکیب تیازولیدینون می‌باشد و تحقیقات مختلف، وجود برخی خصوصیات فعال بیولوژیکی این ترکیب را نشان می‌دهند (۱۰). به طور کلی تیازولیدینون به ویژه ترکیب ۴- تیازولیدین ترکیب مهمی است که با فعالیتهای بیولوژیکی زیادی ارتباط دارد (۲۱). با رشد سریع شیمی آلی، همزمان سنتز مواد رنگرزی و رنگدانه‌ها به طور گسترده‌ای توسعه یافت. یکی از مهم ترین مواد رنگزای آلی، رنگهای آزو هستند که بیش از نیمی از کل مواد رنگزای تولید شده در جهان را تشکیل می‌دهند و تحقیقات اخیر کاربرد آن را در صنایع پزشکی نشان داده، به طوری که ۴۸ درصد از مواد رنگزای با خاصیت دارویی متعلق به مواد رنگزای آزو بوده است (۱۳). در این مطالعه، هیبرید جدیدی از ترکیبات تیازولیدینون و آزو، سنتز، و ویژگی ضد التهابی آن به واسطه فاکتور iNOS مورد مطالعه

قرار گرفت و ساختار این ترکیب جدید به نام آیوپاک ۵-(۲, ۴- بیس (۴- اتوکسی فنیل آزو)- ۳-هیدروکسی بنزیلیدین)-۲, ۴- تیازولیدینون ($TZD\text{-}OCH_2CH_3$) با روشهای مختلف ازجمله NMR و IR مورد تأیید قرار گرفت (۱۶). خصوصیات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی این ترکیب قبلا" مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بسیار امیدوار کننده‌ای حاصل شد (۱۶). در این مطالعه ویژگیهای ضد التهابی این ترکیب بر سلولهای ماکروفاژی موش RAW264.7 به‌واسطه مهار تولید نیتریک اکسید مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد: محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Gibco و محلول پنی‌سیلین/ استرپتومایسین از شرکت Biobasic، خریداری شد. پودر MTT نیز از شرکت سیگما تهیه شد. سایر مواد شیمیایی و محلولها همگی از شرکت Merck خریداری شدند.

سنتز ۵-(۲, ۴- بیس (۴- اتوکسی فنیل آزو)-۳-هیدروکسی بنزیلیدین)-۲, ۴- تیازولیدینون: این ترکیب ($TZD\text{-}OCH_2CH_3$) در اثر واکنش ۴۱۱ میلی‌گرم (۳ میلی‌مولار) نمک دی‌آزونیوم حاصل از پاراتوکسی آنیلیلن با ۳۳۱/۵ میلی‌گرم (۱/۵ میلی‌مولار) از ترکیب جفت شونده ۵-(۳- هیدروکسی بنزیلیدین)-۴،۲- تیازولیدین دیون که حاصل واکنش ۳- هیدروکسی بنزالدئید و ۲, ۴ تیازولیدینون و کاتالیزوری از ترکیب پی پیریدین در حلال اتانول است، در محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار سنتز شد.

کشت سلول Raw264.7: رده سلولی ماکروفاژی Raw264.7 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) تهیه و در ۹۰ درصد محیط کشت کامل DMEM (به صورت محلول حاوی۴/۵ گرم بر لیترگلوکز پیروات، $NaHco_3$، HEPES ۱۵ میلی‌مولار و گلوتامکس) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد محلول استرپتومایسین/پنی‌سیلین در فلاسک $25\ cm^2$ کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت به منظور رشد بهینه سلول انکوبه شد.

سنجش سمیت سلولی ترکیب $TZD\text{-}OCH_2CH_3$:

تستMTT: این تست برای سنجش میزان تکثیر سلولی و تعیین میزان سمیت عوامل مختلف بر روی سلول استفاده می‌شود. در این روش، ابتدا 5×10^3 سلول Raw264.7 در هر یک از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه، کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن، در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت با غلظتهای مختلف (μg/ml ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰) ترکیب $TZD\text{-}OCH_2CH_3$ تیمار شدند. از آنجا که ترکیب مذکور، غیر قطبی می‌باشد، برای حل کردن آن از حلال رایج DMSO استفاده شد. لازم به ذکر است، به منظور به حداقل رساندن اثر سمیت حلال، تلاش شد تا از حداقل آن استفاده شود، بنابراین تست تکمیلی برای بررسی اثر حلال با غلظت به کار رفته بر روی سلولهای مورد استفاده انجام شد (غلظتهای مختلف DMSO ۰/۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۱/۴ درصد حجمی/حجمی در این آزمون سنجیده شد). غلظت نهایی حلال در تمام چاهکها به میزان یکسان و کمتر از ۰/۶ درصد انتخاب شد. سپس غربالگری سمیت این ترکیب با استفاده از MTT انجام گرفت و میزان جذب نمونه‌های تیمار شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (ساخت شرکت BioTek آمریکا) اندازه گیری شد.

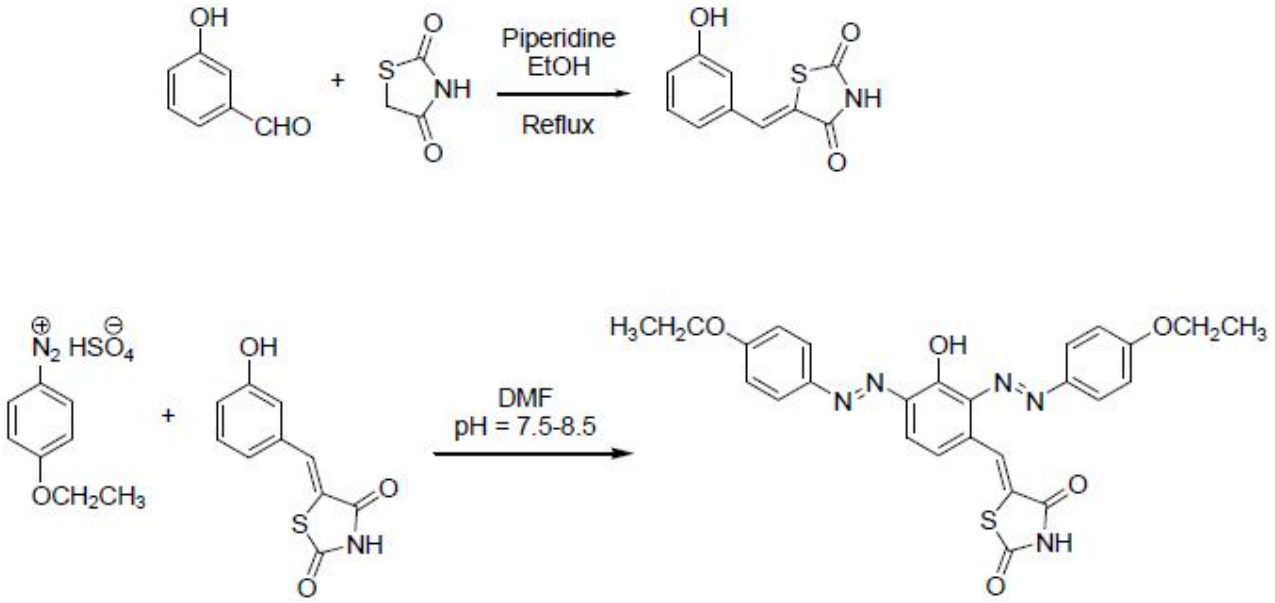
تحریک سلولهای ماکروفاژی Raw264.7 با لیپو پلی ساکارید (LPS): جهت تحریک و فعال نمودن مسیرهای التهابی سلولهای Raw264.7، از LPS با غلظت ۱ μg/ml در محیط کشت سلول استفاده شد. به طوری که سلولها به مدت ۱۸ ساعت همراه با LPS در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه

شدند. سپس به منظور مطالعه تأثیر ترکیب TZD-OCH_2CH_3 بر میزان فعالیت آنزیم iNOS در سلول تحریک شده با LPS و بر اساس نتایج حاصل از تست MTT، سلولها با غلظتهای ۳۰ و ۶۰ μg/ml از ترکیب مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند.

سنجش میزان تولید نیتریک اکسید (NO): سنجش NO با استفاده از معرف Griess (۱ درصد سولفانیل آمید، ۰/۱ درصد نفتیل اتیلن آمید دهیدروکلراید در ۲/۵ درصد فسفریک اسید) انجام گرفت (۱۴ و ۲۳). بدین صورت که سلولها پس از ۲۴ ساعت تیمار با ترکیب موردنظر، از انکوباتور خارج شده و مایع رویی آنها به ویالهای ۱/۵ ml انتقال داده شد. پس از سانتریفیوژ در دور پایین، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به همراه۱۰۰ میکرولیتراز ترکیب Griess به پلیت ۹۶ خانه دیگری انتقال یافت و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد. در ادامه با استفاده از دستگاه ثبت الایزا، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. همچنین جهت سنجش مقدار NO تولید شده توسط iNOS، منحنی استاندارد رسم شد. بدین منظور غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرو مولار نیتریت سدیم مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتیجه سنتز ترکیب ۵-(۲, ۴- بیس (۴- اتوکسی فنیل آزو)-۳-هیدروکسی بنزیلیدین)-۲, ۴- تیازولیدینون: بعد از سنتز ترکیب هیبریدی TZD-OCH_2CH_3، جهت مطالعه و تأیید ساختار این ترکیب از روشهای مختلفی استفاده شد از جمله روش NMR، IR و غیره. با توجه به ساختار به دست آمده از NMR جرم مولکولی این ترکیب ۵۱۷ گرم بر مول تخمین زده شد (۱۶). شکل ۱ نشان دهنده واکنش کلی سنتز TZD-OCH_2CH_3 است.

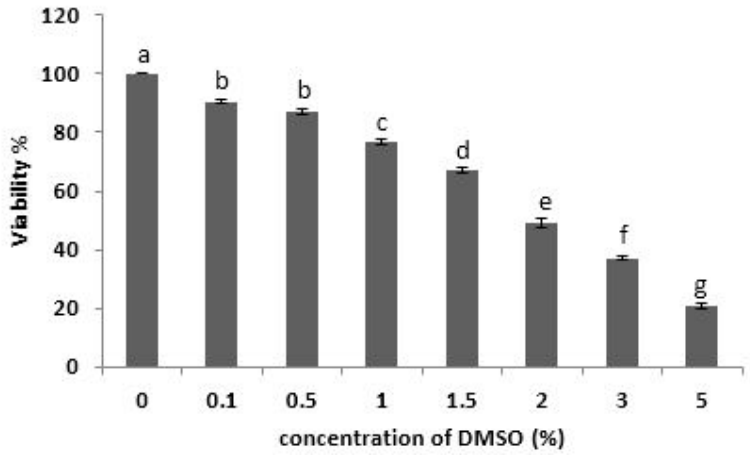


شکل۱. واکنش کلی سنتز ترکیب TZD-OCH_2CH_3

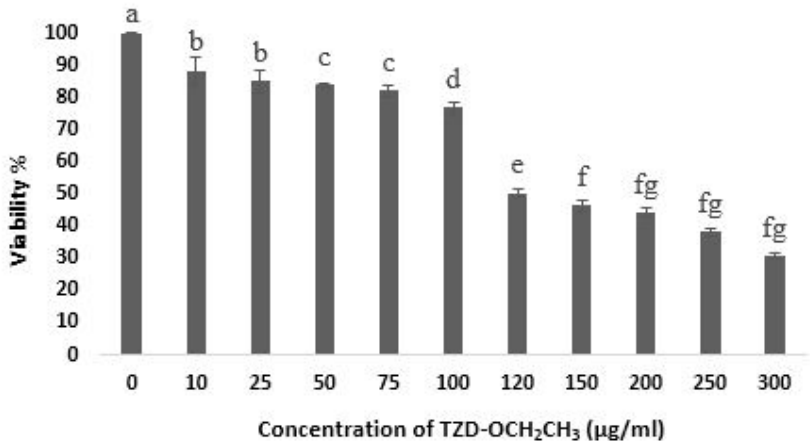
نتایج بررسی سمیت حلال (DMSO) بر روی سلولهای Raw264.7: برای بررسی اثر حلال با غلظت به کار رفته بر روی سلولهای مورد استفاده، تست تکمیلی انجام شد که نتایج حاکی از عدم سمیت معنادار حلال تا غلظت ۱ درصد بود. همان طوری که از شکل ۲ مشخص

است، اختلاف معناداری در مقادیر بالاتر از ۱ درصد DMSO مشاهده می‌شود ($P<0.01$). بنابراین با اطمینان می‌توان نتیجه گیری کرد که سمیت به دست آمده مربوط به خود ترکیب است نه حلال.

نتایج بررسی کشندگی ترکیب $TZD\text{-}OCH_2CH_3$: رده سلولی Raw264.7 با غلظتهای مختلف ترکیب $TZD\text{-}OCH_2CH_3$ تیمار شد و نتایج MTT اختلاف معناداری را در مهار رشد سلولهای تیمار شده نشان داد ($P<0/01$). بر اساس شکل ۳ غلظتی از ترکیب که توانایی مهار ۵۰ درصد سلولها را دارد (IC_{50})، معادل ۱۲۰ μg/ml به دست آمد.



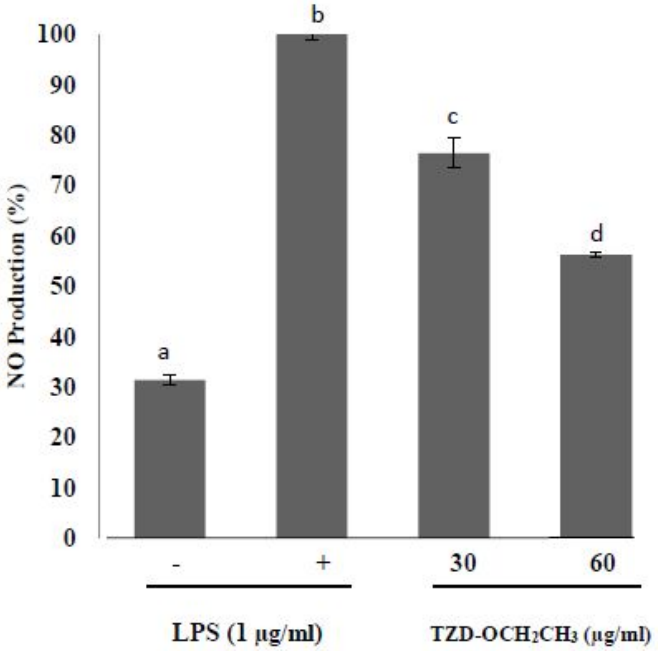
شکل ۲- درصد سلولهای زنده RAW264.7 تیمار شده با غلظتهای مختلف (۵-۰ برحسب درصد) DMSO با سطح احتمالی $p<0.01$.



شکل ۳- درصد زیستایی سلول RAW264.7 تیمار شده با غلظتهای مختلف ترکیب $TAD\text{-}OCH_2CH_3$ (۳۰۰-۰ میکروگرم در میلی لیتر). آنالیز آماری با استفاده از روش one way ANOV صورت گرفت. حروف یکسان نشان از همسانی گروهها دارد و سطح احتمال $p<0.01$ اختلاف معنا دار در مهار رشد سلولهای تیمار شده است.

نتایج سنجش نیتریک اکسید (NO): نیتریک اکسید ترکیب ناپایداری است و سریعا" به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود. به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر (۱۵ تا ۴۵ ثانیه)، سنجش مستقیم نیتریک اکسید (NO_2^-) کمی مشکل است (۲۲). لذا مقدار نیتریت به عنوان متابولیت پایدار از NO جهت سنجش آنزیم iNOS در غلظتهای (۳۰ و μg/ml

۶۰) به روش Griess اندازه گیری می‌شود. با توجه به نتایج منحنی استاندارد NO میزان خطی بودن درحدود ۰/۹۹۸ می‌باشد و شکل ۴ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، میزان مهار iNOS افزایش یافته و در نتیجه تولید NO کاهش یافته است.



شکل ۴- سنجش میزان نیتریک اسید تولید شده توسط سلولهای RAW264.7 در حضور و عدم حضور LPS. اثر غلظتهای ۳۰ و ۶۰ TZD-OCH_2CH_3 بر میزان تولید NO بعد از ۱۸ ساعت تیمار سلولها با LPS. بر اساس آنالیز آماری اختلاف معنی دار بین تمامی تیمارها مشاهده شد ($p<0.01$).

بحث

با توجه به سونامی سرطان در اکثر کشورها، پیشگیری و کنترل این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. امروزه محققان روشهای درمانی تجربی مختلفی را مطرح می کنند، اما هر کدام از این روشها محدودیتها و مشکلات خاص خود را دارد. برای غلبه بر این مشکلات شناخت مسیرهای مختلف پیام رسانی سلولی و همچنین طراحی ترکیبات کارآمدتر و مؤثرتر به منظور درمان هدفمند بسیار با اهمیت است. یکی از این ترکیبات سنتزی، تیازولیدینون است که جایگاه مهمی در عرصه شیمی دارویی و همچنین صنایع غذایی دارد. مطالعات بیشماری بر روی ویژگیهای ضد سرطانی مشتقات مختلف این ترکیب صورت گرفته است. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۴، نتایج مطالعات Veeresa Gududuru و همکارانش بر روی مشتق ۲-آریل-۴-اکسو-تیازولیدین-۳-ایل آمید در رده‌های سلولی سرطان پروستات (DU-145, PC-3, LNCaP, PPC-1, and TSU) نشان دهنده سمیت بالای این مشتق برای سلولهای سرطانی و همچنین ویژگیهای ضد تکثیری قابل ملاحظه این ترکیب بود (۴ و ۱۶). در سال ۲۰۱۴، تیم کاری این تحقیق، جدیدترین مشتق این ترکیب با نام ۵-(۲, ۴- بیس (۴-اتوکسی فنیل آزو)-۳-هیدروکسی بنزیلیدین)-۲, ۴-تیازولیدینون را سنتز و خصوصیات بیولوژیکی آن را مطالعه نمود که نتایج امیدوارکننده خصوصیات بیولوژیکی این مشتق، باعث طراحی مطالعه جدیدی بر روی ویژگیهای ضد التهابی آن در رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7 شد. یکی از فاکتورهای مهم درمسیر مستقل از آراشیدونیک اسید، فاکتور نیتریک اکسید مشتق شده از آرژنین به‌واسطه نیتریک اکسید سنتاز القایی است که نقش مهمی در این

مسیر دارد. با توجه به اهمیت نیتریک اکسید در التهاب، این فاکتور برای بررسی اثر ضد التهابی در این مطالعه انتخاب شد. از آنجایی که ترکیب مذکور غیر قطبی است، این ترکیب در حلال آلی DMSO با غلظت ۰/۶درصد حل گردید. با توجه به اینکه در اکثر مطالعات غلظت زیر ۱ درصد DMSO برای حل کردن ترکیب در نظر گرفته می‌شود، لذا در این تحقیق نیز از حداقل DMSO که هیچ گونه سمیت برای سلول نداشته باشد، استفاده گردید (۲ و ۳). پس از تیمار سلولهای RAW264.7 با غلظتهای مختلف (۰ تا ۳۰۰ μg/ml) ترکیب $TZD\text{-}OCH_2CH_3$، نتایج نشان دهنده، سمیت مناسب مشتق سنتز شده بر روی سلولها بود، به طوری که IC_{50} ترکیب ۱۲۰ μg/ml به دست آمد که قابل مقایسه با IC_{50} ۳۰ μg/ml، ۸۵، ۱۰۰ مشتقات مختلف thiazolidin-4-ones بر رو رده سلولی سرطانی MCF-7 است (۸). در کل هرچقدر مقدار عددی IC_{50} ترکیب پایین باشد نشان دهنده میزان بالای سمیت آن بر سلولها می‌باشد. این در حالی است که تحقیقات مختلف با موضوع تأثیر مشتقات مختلف تیازولیدینون بر روی رده‌های سلولی مختلف نتایج بسیار متفاوتی را از میزان و نوع تأثیر چنین مشتقی نشان می‌دهند (۱۰).

در ادامه برای فعال کردن ویژگیهای التهابی سلولهای ماکروفاژی، ترکیب LPS با غلظت ۱ μg/ml استفاده گردید. ترکیب LPS باعث فعال شدن مسیر NF-kB در سلولها می‌شود و در ادامه، این فاکتور رونویسی می‌تواند میزان بیان ژنهایی همچون iNOS و COX-2 را افزایش دهد (۲۰). بنابراین در این مطالعه جهت سنجش میزان فعالیت iNOS میزان ترکیب NO به عنوان محصول فعالیت iNOS توسط معرف Griess سنجش گردید. میزان مهار تولید NO توسط غلظتهای۳۰ و ۶۰ μg/ml مشتق سنتز شده در شکل ۴ نمایش داده شده است. در مطالعه دیگری که در سال ۱۳۹۲ انجام شد و تأثیر داروی آیمود به عنوان مهار کننده iNOS بررسی و گزارش شد که این دارو در رقتهای۱/۸۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ میکرومولار دارای خاصیت ضد التهابی می‌باشد (۱). با توجه به نتایج تست MTT و همچنین درصد مهار تولید NO می توان مشتق $TZD\text{-}OCH_2CH_3$را به عنوان ترکیبی که پتانسیل خوبی ویژگیهای ضد التهابی از خود نشان می دهد معرفی نمود. هرچند برای اطمینان از تأثیر این مشتق بر دیگر فاکتورهای درگیر در مسیر التهابی باید مطالعات و بررسیهای جامع تری صورت پذیرد. به همین دلیل، هم اکنون در آزمایشگاه مربوط به این تحقیق، تأثیر این ترکیب بر میزان بیان NF-kB در سطوح مختلف mRNA و پروتئین، در حال مطالعه است. همچنین ویژگیهای القای آپوپتوزی این ترکیب نیز در سلولهای سرطانی پستان MCF-7 در حال بررسی می‌باشد که تا حال نتایج بسیار امیدوارکننده ای حاصل شده است.

منابع

۱. بنفشه امیر اصلانی ، فرزانه صابونی، شاه صنم عباسی ، مولود میررضوی ، حبیب الله ناظم ، حمیدرضا خرم خورشید و محمدصادق ثابت (۱۳۹۲) اثر داروی گیاهی آیمود برتولید نیتریک اکساید در سلولهای میکروگلیای ملتهب، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۶، صفحات ۲۴۲-۲۵۰ .

۲. مهرو وهابی، شاهرخ صفریان، سید جلال زرگر و لعیا علی اصغری (۱۳۹۳) مطالعه کمی بیان ژنهای دخیل در مسیرهای بقای سلولی و اتوفاژی در رده سلولی T-47D با تأکید بر اعمال مقاومت سرمایی در سلولها در حضور DMSO ، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۷، صفحات ۴۳۸-۴۵۲

3. Chapelsky, S., Batty, S., Frost, M. and Mogridge, J. (2008) Inhibition of anthrax lethal toxin-induced cytolysis of RAW264. 7 cells by celastrol. PLoS One, 3, 14-21.

4. Gududuru, V., Hurh, E., Dalton, J. T. and Miller, D. D. (2004) Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amides for prostate cancer. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 14, 5289-5293.

5. Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M. and Moilanen, E. (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein,

kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. Mediators of inflammation.

6. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. cell, 100, 57-70.

7. Hofseth, L. J. (2008) Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. Cancer letters, 268, 10-30.

8. Isloor, A. M., Sunil, D., Shetty, P., Malladi, S., Pai, K. S. R. and Maliyakkl, N. (2013) Synthesis, characterization, anticancer, and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-ones in MCF-7 cells. Medicinal Chemistry Research, 22, 758-767.

9. Issa, A. Y., Volate, S. R. and Wargovich, M. J. (2006) The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 405-419.

10. Jain, A. K., Vaidya, A., Ravichandran, V., Kashaw, S. K. and Agrawal, R. K.(2012) Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. Bioorganic & medicinal chemistry, 20, 3378-3395.

11.Kaminska, B. (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapyâ€"from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1754, 253-262.

12. Lechner, M., Lirk, P. and Rieder, J. (2005) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. In Seminars in cancer biology, Vol. 15 Elsevier, pp. 277-289.

13. Lee, H. J., Yeo, S. Y. and Jeong, S. H. (2003) Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. Journal of Materials Science, 38, 2199-2204.

14. Lyons, C. R., Orloff, G. J. and Cunningham, J. M. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. Journal of Biological Chemistry, 267, 6370-6374.

15. Magda, A. A., Abdel-Aziz, N. I., Alaa, A. M., El-Azab, A. S., Asiri, Y. A. and ElTahir, K. E. H. (2011) Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: molecular docking study. Bioorganic & medicinal chemistry, 19, 3416-3424.

16. Mohammadi, A., Ghafoori, H., Ghalami-Choobar, B. and Rohinejad, R.(2014) Synthesis, solvatochromic properties and biological evaluation of some novel azo-hydrazone tautomeric dyes. Journal of Molecular Liquids, 198, 44-50.

17. Sala, M., Chimento, A., Saturnino, C., Gomez-Monterrey, I. M., Musella, S., Bertamino, A., Milite, C., Sinicropi, M. S., Caruso, A. and Sirianni, R.(2013) Synthesis and cytotoxic activity evaluation of 2, 3-thiazolidin-4-one derivatives on human breast cancer cell lines. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 23, 4990-4995.

18.Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. (2014) Cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 64, 9-29.

19. Steele, V. E., Hawk, E. T., Viner, J. L. and Lubet, R. A. (2003) Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 523, 137-144.

20.Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. and Margioris, A. N. (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. The international journal of biochemistry & cell biology, 38, 1654-1661.

21. Verma, A. and Saraf, S. K. (2008) 4-Thiazolidinone A biologically active scaffold. European journal of medicinal chemistry, 43, 897-905.

22. William's D. (2004), Nitric oxide in biological system. Nitric oxide journal, 28: 161-169

23. Yang, E.-J., Yim, E.-Y., Song, G., Kim, G.-O. and Hyun, C.-G. (2009) Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. Interdisciplinary toxicology, 2, 245-249.

24. Yoon, J.-H. and Baek, S. J. (2005) Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. Yonsei medical journal, 46, 585-596.

Anti-inflammatory effects of novel thiazolidinedione derivative on RAW 264.7 cells stimulated with LPS

Rezaei M.[1], Ghafoori H. [2], Jamalzadeh. L[2], Aghamaali M.[2] and Mohammadi A.[3]

[1] **Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, University Campus 2, Rasht, I.R. of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran**

[3] **Chemistry Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran**

Abstract

Previous data have shown that the thiazolidinediones and their derivatives are found to possess divergent and very interesting biological activities such as, antioxidant and antibacterial activities. In this study, we investigated the cytotoxicity and inhibitory effects of synthesized TZD-OCH_2CH_3 on lipopolysaccharide (LPS)-induced over-expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) using Raw 264.7 cells. To assess whether the tested TZD-OCH_2CH_3 affected cell viability, RAW 264.7 cells were incubated with LPS (1µg/ml) in the presence of different TZD-OCH_2CH_3 concentrations (0-300 µg/ml). The results of MTT assay showed that TZD-OCH_2CH_3 had cytotoxicity at higher concentrations of 50 µg/ml (IC_{50}=120 µg/ml). We then further evaluated the inhibitory activity of different TZD OCH_2CH_3 concentrations (30 and 60 µg/ml) against NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The synthesized TZD-OCH_2CH_3 was found to have the most significant inhibitory effect on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. These findings demonstrated that TZD-OCH_2CH_3 has good anti-inflammatory activity and thus has great potential for use in the control of various inflammatory diseases.

Key words: Thiazolidinedione, RAW264.7, Anti-inflammatory and Inducible nitric oxide synthase