

Cytotoxic Effects of Dibromoisatin Derivatives on Hela and HepG2 Cell Lines Using MTT Assay

Mohammad Shokrzadeh¹,
Saied Emami²,
Melika Amirzadeh³,
Mona Modanloo⁴

¹ Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Pharmacy student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Researches Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 19, 2016 Accepted June 17, 2017)

Abstract

Background and purpose: Tumors are one of the most important threats to human life and improving the drugs used in their treatment is always necessary. Isatin is found in many plants and also synthesized through different methods. Many studies have been done on Isatin ring, including the construction of Dibromoisatin derivatives that exhibit anti-cancer effects. The aim of this study was to determine the cytotoxic effects of Dibromoisatin derivatives on cervical and liver cancer cells.

Materials and methods: In this study, 10 Dibromoisatin derivative made at concentrations of 1, 50, 100, 200, and 400 µg/mL were tested against cervical (HeLa) and liver cancer cell lines (HepG2). The cell viability was assessed by MTT assay and the IC50 value was calculated in PRISM software.

Results: Comparing the cytotoxic effects of Dibromoisatin derivatives showed that the highest cytotoxic effects in both cell lines was detected in composition No. 9 with IC50 value of HepG2= 1.194 and IC50 value of HeLa= 0.025.

Conclusion: These derivatives were more effective against liver cancer cells and some Dibromoisatin derivatives were found to have high toxicity against cancer cells, therefore, they could be of great benefit in improving the drugs used in chemotherapy.

Keywords: Dibromoisatin, cytotoxicity, liver cancer, cervical cancer

بررسی اثرات سمیت سلولی مشتقات دی برموایزاتین بر رده های سلولی Hela و HepG2 به روش MTT

محمد شکرزاده¹سعیدامامی²ملیکا امیرزاده³منا مدانلو⁴

چکیده

سابقه و هدف: تومورهای یکی از مهم ترین تهدیدات زندگی انسان در دنیاست، و بهبود داروهای مورد استفاده در درمان آن‌ها همیشه مورد نیاز بوده است. ایزاتین به‌طور طبیعی در بسیاری از گیاهان وجود دارد، هم‌چنین به‌طور صناعی توسط روش‌های مختلفی سنتز می‌شود. مطالعات زیادی بر روی حلقه ایزاتین انجام شده از جمله ساخت مشتقات دی برموایزاتین که می‌تواند اثرات ضد سرطانی از خود نشان دهد. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات سمیت سلولی مشتقات دی برموایزاتین بر سلول‌های سرطانی سرویکس و کبدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه 10 مشتق از دی برموایزاتین ساخته شده با غلظت‌های 400 و 200، 100، 50، 10 و 1 μg/mL بر روی خطوط سلولی سرطانی کبد (HepG2) و سرویکس (HeLa) تاثیر داده شد تا میزان حیات سلولی آنها به روش MTT مورد ارزیابی قرار گیرد و سپس IC50 با استفاده از نرم افزار prism محاسبه شد.

یافته‌ها: مقایسه اثرات سمیت سلولی مشتقات دی برموایزاتین نشان می‌دهد که در بین این مشتقات بیشترین اثر سایتوتوکسیک در هر دو رده سلولی مربوط به ترکیب شماره 9 می‌باشد. IC50 مربوط به رده سلولی HepG2 برابر با 1,194 و IC50 مربوط به رده سلولی HeLa برابر با 0,025 است.

استنتاج: این مشتقات بر سلول‌های سرطانی کبدی موثرتر واقع شدند و نشان داده شد بعضی از مشتقات دی برموایزاتین بر روی سلول‌های سرطانی سمیت بالایی دارند، که در ساخت داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند مورد توجه قرار بگیرند.

واژه های کلیدی: دی برموایزاتین، سمیت سلولی، سرطان کبد، سرطان سرویکس

مقدمه

قبیل انواع جابجایی‌ها و ظهور ترتیب‌های ژنی تقویت شده، مهار عوامل کنترل‌کننده و تنظیم‌کننده سرعت چرخه سلولی و در نتیجه تکثیر لجام گسیخته سلول‌ها را بروز دهند که منجر به ایجاد تومورهای موضعی می‌شود

سرطان نوعی بیماری سلولی است که مشخصه آن تغییر در مکانیسم‌های کنترل‌کننده تکثیر و تمایز سلولی می‌باشد. معمولاً سلول‌هایی که دچار تغییرات نئوپلاستیک می‌شوند، ممکن است اختلالات ناچیزی از

Email: dr_modanloo@yahoo.com

مؤلف مسئول: منا مدانلو - مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

1. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ساری، ایران

3. دانشجوی دکتری داروسازی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ساری، ایران

4. دانشجوی دکتری پژوهشی سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

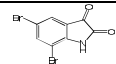
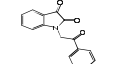
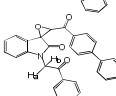
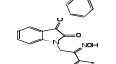
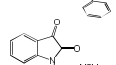
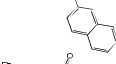
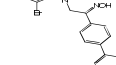
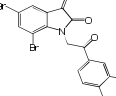
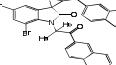
تاریخ دریافت: 1395/8/29 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/11/12 تاریخ تصویب: 1396/3/27

یکی از خاصیت‌های ضد سرطانی آن که در اکثر مشتقات تولید شده از ایزاتین مشاهده شده است خاصیت مهار توبولین‌ها بوده است. مکانیسم اثر سمیت سلولی مشتقات ایزاتین بسیار شبیه به مکانیسم داروی شیمی‌درمانی وین‌بلاستین می‌باشد که با مهار پلیمریزاسیون توبولین سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند (8). به این جهت در این مطالعه ساخت مشتقات ایزاتین با هدف فعالیت سیتوتوکسیسیته مورد نظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) مشتقات دی برموا ایزاتین که توسط دکتر امامی و دکتر سمساریان سنتز شده بود (9).

جدول شماره 1: مشتقات دی برموا ایزاتین

شماره ترکیب	ساختار	فرمول شیمیایی
1		5,7-Dibromoindoline-2,3-dione
2		1-(2-((1,1'-Biphenyl)-4-yl)-2-oxoethyl)indoline-2,3-dione
3		3'-((1,1'-Biphenyl)-4-carbonyl)-1-(2-((1,1'-biphenyl)-4-yl)-2-oxoethyl)spiro[indoline-3,2'-oxiran]-2-one
4		1-(2-((1,1'-Biphenyl)-4-yl)-2-(hydroxyimino)ethyl)indoline-2,3-dione
5		1-(2-(Hydroxyimino)-2-(naphthalen-2-yl)ethyl)indoline-2,3-dione
6		1-(2-((1,1'-Biphenyl)-4-yl)-2-(hydroxyimino)ethyl)-5,7-dibromoindoline-2,3-dione
7		1-(2-((1,1'-Biphenyl)-4-yl)-2-(hydroxyimino)ethyl)-5,7-dibromoindoline-2,3-dione
8		3-(2-Naphthoyl)-5,7-dibromo-1-(2-(naphthalen-2-yl)-2-oxoethyl)spiro[indoline-3,2'-oxiran]-2-one
9		5,7-Dibromo-1-(2-(hydroxyimino)-2-phenylethyl)indoline-2,3-dione

که می‌تواند ساختمان‌های طبیعی مجاور را تحت فشار یا تهاجم قرار دهد و نیز به اعضای گوناگون بدن مهاجرت (متاستاز) نموده و پیشروی نئوپلازی را همراهی نماید. سرانجام مجموع فرایندهای تهاجمی، متاستاز و اختلالات متابولیک ناشی از سرطان باعث بروز بیماری و مرگ بیمار می‌شود (1، 2).

هدف درمان سرطان ریشه‌کن کردن کامل آن است. اگر این هدف اولیه قابل انجام نباشد، تسکین، بهبود علائم و حفظ کیفیت زندگی بیمار، جایگزین آن خواهد شد. اصول درمان سرطان، تسریع درمان است. به‌طور کلی یکی از چالش‌های موجود در زمینه سرطان این است که روش‌های متفاوت درمانی به تنهایی یا همراه با هم به‌نحوی استفاده شوند که بیمار حداکثر بهره را ببرد. روش‌های درمان سرطان به چهار دسته تقسیم می‌شوند.

1. جراحی

2. پرتودرمانی (شامل درمان فتودینامیک)

3. شیمی‌درمانی (از جمله هورمون درمانی)

4. درمان بیولوژیک (شامل ایمنی درمانی، درمان با عوامل ایجادکننده تمایز و عواملی که بر بیولوژی سلول سرطانی اثر گذار هستند)

معمولاً شیمی‌درمانی و درمان بیولوژیک جزء درمان‌های سیستمیک محسوب می‌شوند (1، 2).

توبولین یک پلیمر گلوبولار با وزن مولکولی 100000 دالتون بوده که در حضور گوانوزین تری فسفات به صورت هترو دایمر در می‌آید. میکروتوبول‌ها اعضای زنده سلولی و مسئول بسیاری از انتقالات مهم داخل سلولی هستند. هم‌چنین تثبیت‌کننده‌ی فرایندهای داخل سلولی و تشکیل‌دهنده دوک تقسیم در حین میتوز می‌باشند. عوامل ضد میتوز به توبولین می‌چسبند و باعث دپلیمریزه شدن میکروتوبول و یا ناپایداری آن می‌شوند. ترکیبات وین کریستین، وین بلاستین و پاکلی تاکسل جز ترکیبات متصل شونده به توبولین می‌باشند (3، 4).

در سال‌های اخیر دانشمندان ترکیب آلی ایزاتین را شناسایی و بررسی کرده‌اند که خواص ضد میکروبی، ضد تشنجی و ضد سرطانی داشته است (5، 6، 7).

ب) نگهداری و کشت سلولی:

انکوباسیون، سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند تا از چگونگی رشد سلول‌ها و عدم آلودگی آن‌ها، اطمینان حاصل شود؛ سپس 50 میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های 1، 400، 200، 100، 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر از مشتقات دی برمو ایززاتین و 50 میکرولیتر از غلظت‌های 1، 400، 200، 100، 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی اتوپوزاید، به سلول‌ها اضافه کردیم، و به مدت 72 ساعت انکوبه شد. 100 میکرولیتر محلول MTT را به هر چاهک اضافه کردیم و به مدت 4 ساعت در انکوباتور 37 درجه قرار دادیم؛ سپس محیط کشت رویی را خارج کردیم و به هر چاهک 50 میکرولیتر محلول رقیق شده DMSO اضافه کردیم و بعد از 15 دقیقه، جذب نوری هر چاهک با دستگاه الیزا در دو طول موج 490 و 690 خوانده شد (13).

د) آنالیز آماری:

کلیه محاسبات آماری برای مقایسه IC50ها با استفاده از نرم افزار آماری Prism Ver.3 به روش رگرسیون غیر خطی (non linear Regression) انجام شد و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه

(Tukey-Krame multiple comprehension test) با نرم افزار Prism Ver.3 صورت گرفت (14).

یافته‌ها

مقادیر IC50، محاسبه شده بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای مشتقات دی برمو ایززاتین در جدول زیر آورده شده است:

در این مطالعه رده‌های سلولی سرطانی HeLa و HepG2 که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شده بودند، از پاساژهای سلولی در محیط کشت DMEM با 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات 100 میلی مولار، سدیم بیکربنات 1.5 g/l و 1 درصد انتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین که در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتیگراد و رطوبت کافی و میزان 5 درصد دی اکسید کربن نگهداری می‌شد، استفاده شد. زمانی که سلول‌ها حداقل به 70 درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین - اتیلن دی امین تتراسستیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شده و در دور rpm 1500 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شده و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو (4 درصد w/v در PBS) (10) با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌ها با درصد زنده بودن بالای 90 درصد برای انجام تست استفاده شد (11، 12).

ج) بررسی سمیت سلولی مشتقات دی برمو ایززاتین به روش MTT:

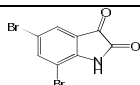
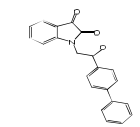
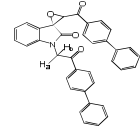
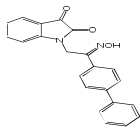
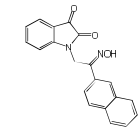
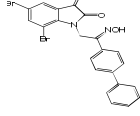
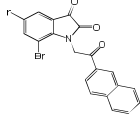
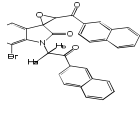
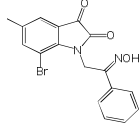
50 میکرولیتر محیط کشت DMEM/F12 که حاوی 10^5 عدد سلول بود، به هر چاهک پلیت 96 خانه‌ای اضافه کردیم (برای هر غلظت از مشتقات دی برمو ایززاتین و دارو اتوپوزاید 3 چاهک در نظر گرفته شد). و به مدت 72 ساعت در انکوباتور قرار دادیم؛ طی زمان

IC50 برابر با 1/194 بیشترین سمیت را بر روی این رده سلولی داشت.

همچنین در رده سلولی HeLa، ترکیب شماره 5 با IC50 برابر با 218/4 کمترین و ترکیب شماره 9 با IC50 برابر با 0/025 بیشترین سمیت را بر روی این رده سلولی داشت.

ترکیب شماره 1 در رده سلولی HepG2، IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=5.257). ترکیب شماره 2 در رده سلولی HepG2، دارای IC50 برابر با 10,51 بود. ترکیب شماره 3 در رده سلولی HepG2، IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=4.368). ترکیب شماره 4 در روی رده سلولی HepG2 دارای IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید بود (IC50=2.439). ترکیب شماره 5 در هر دو رده سلولی HepG2 و HeLa، IC50 بیشتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=188.3). ترکیب شماره 6 در رده سلولی HepG2، IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=3.088). ترکیب شماره 7 در رده سلولی HeLa، IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=3.244). ترکیب شماره 8 در هر دو رده سلولی HepG2 و HeLa، IC50 بیشتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=52.20). ترکیب شماره 9 در هر دو رده سلولی HeLa و HepG2، IC50 کمتری نسبت به داروی اتوپوزاید داشت (IC50=1.194). IC50=0.0246 (رده سلولی HeLa)

جدول شماره 2: IC 50 مشتقات دی برموایزاتین و داروی

ردیف	ساختار	میزان IC50 بر روی رده سلولی HepG2 (میکروگرم بر میلی لیتر)	میزان IC50 بر روی رده سلولی HeLa (میکروگرم بر میلی لیتر)
1		5.257	84.91
2		10.51	135.4
3		4.368	56.27
4		2.439	71.37
5		188.3	218.4
6		3.088	49.09
7		16.84	3.244
8		52.20	73.36
9		1.194	0.025
10	داروی اتوپوزاید	8.214	8.214

بحث

از آنجایی که در سالهای اخیر اثرات ضد سرطانی مشتقات ایزاتین مورد توجه قرار گرفته بود، طی این

در این جدول در رده سلولی HepG2، ترکیب شماره 5 با IC50 برابر با 188/3 کمترین و ترکیب شماره 9 با

در این رده سلولی بیشترین میزان IC50، یا همان کمترین میزان سمیت مربوط به ترکیب شماره 5 با میزان IC50 برابر با 188/3 است؛ این ترکیب ساختاری مشابه ترکیب شماره 4 دارد با این تفاوت که ترکیب شماره 4 دارای استخلاف بی فنیل است ولی ترکیب شماره 5 دارای استخلاف نفتالن است.

در رده سلولی HeLa مشتقات دارای استخلاف برم در موقعیت‌های 5 و 7، مانند ترکیبات شماره 7 و 9 موثرتر بودند؛ این گفته در مقایسه ترکیب شماره 4 با 6 نیز دیده می‌شود؛ ترکیب شماره 4 و 6 ساختاری مشابه دارند با این تفاوت که ترکیب شماره 4، که فاقد استخلاف برم در موقعیت‌های 5 و 7 است میزان IC50 بالاتر یا همان سمیت کمتری را داراست (IC50 ترکیب شماره 4 برابر با 71/37 است و IC50 ترکیب شماره 6 برابر 49/09 است).؛ این اثر در رده سلولی HepG2 نیز دیده شد، بنابراین حضور برم در موقعیت‌های 5 و 7 می‌تواند در سمیت ترکیبات نقش داشته باشد.

ترکیبات شماره 5 و 4 نیز ساختاری مشابه دارند، با این تفاوت که ترکیب شماره 4 دارای استخلاف بی فنیل و میزان IC50 کمتری است در مقایسه با ترکیب شماره 5 که به جای استخلاف بی فنیل نفتالن است؛ با این حال ترکیب شماره 7 نیز دارای استخلاف نفتالن است ولی سمیت خوبی از خود نشان داده است (IC50). ترکیب شماره 7 برابر 3/24 است.

دو ترکیب دیگری که ساختار مشابه داشتند، ترکیبات شماره 2 و 4 هستند؛ با این تفاوت که ترکیب شماره 4، به جای استخلاف کربونیل در ترکیب شماره 2، دارای استخلاف اکسیم است و میزان IC50 کمتر و سمیت بیش‌تر است؛ با این حال ترکیب شماره 5 نیز دارای استخلاف اکسیم است ولی میزان IC50 اش بسیار بالاست (IC50 ترکیب شماره 5 برابر 218/4 است).

در بین مشتقات سنتزی دی برم ایزاتین بیشترین اثر سایتوتوکسیک در هر دو رده سلولی مربوط به

مطالعه سمیت مشتقاتی از ایزاتین بر روی رده‌های سلولی HepG2 و HeLa مورد ارزیابی قرار گرفت؛ با یک بررسی در روند کلی مقدار عددی IC50 محاسبه شده ترکیبات شیمیایی سنتزی بر خطوط سلولی سرطانی مورد ارزیابی، مشخص می‌گردد که میزان IC50، در رده سلولی سرطانی کبد انسان (HepG2) نسبت به رده سرطانی سرویکس (HeLa) کمتر بوده، که نشان دهنده این موضوع است که این ترکیبات بر سلول‌های سرطانی کبدی موثرتر هستند.

با یک بررسی در ساختار ترکیبات سنتزی مشاهده می‌شود که مشتقات دارای استخلاف اکسیم، مانند ترکیبات شماره 4 و 6، بیشترین اثر را بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 داشتند؛ این گفته هم‌چنین در مقایسه ترکیب شماره 2 با 4، که ساختاری مشابه دارند و تنها تفاوت آن‌ها در این است که ترکیب شماره 2 دارای استخلاف کربونیل و ترکیب شماره 4 دارای استخلاف اکسیم است، میزان IC50 ترکیب شماره 4 برابر با 2/44 و IC50 ترکیب شماره 2 برابر با 10/51 بوده که این نشان‌دهنده سمیت بیش‌تر ترکیب شماره 4 است. در رده سلولی HepG2، موثرترین ترکیب، ترکیب شماره 9 است (IC50 برابر با 1/194)؛ که دارای استخلاف اکسیم و هم‌چنین استخلاف برم در موقعیت‌های 5 و 7 است.

افزودن یک حلقه بنزن به ساختار ترکیب شماره 9 و تبدیل کردن استخلاف فنیل به بی فنیل (ایجاد ترکیب شماره 6) باعث افزایش IC50 و کاهش سمیت ترکیب شده است.

در مقایسه ترکیب شماره 4 با ترکیب شماره 6، که هر دو ساختاری مشابه و دارای استخلاف اکسیم و بی فنیل هستند، عدم حضور برم در موقعیت‌های 5 و 7 در ترکیب شماره 4، باعث کاهش میزان IC50 و افزایش سمیت این ترکیب شده است (IC50). ترکیب شماره 4 برابر با 2/44 و IC50 ترکیب شماره 6 برابر با 3/09 است.

HeLa سمیت خوبی داشت و به ترتیب دارای IC_{50} 0,025 و 1,194 بود، که با مطالعه Matesic و همکارانش هماهنگ بود.

بنابراین به طور کلی می توان گفت که حضور استخلافات اکسیم روی زنجیره کربنی متصل به N حلقه ایندول، و برم در موقعیت های 5 و 7 می تواند در سایتو توکسیک بودن ترکیبات موثر باشد.

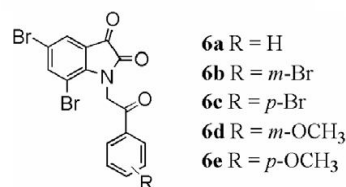
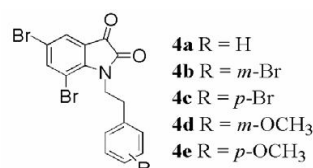
نتیجه مهم حاصل از این مطالعه این است که می توان با قرار دادن استخلافات ویژه و خاص مثل زنجیره کربنی 2-3 کربنه، اکسیم و حلقه آروماتیک روی نیتروژن حلقه ایندول و بروم در موقعیت های 5 و 7، ترکیباتی سایتو توکسیک تهیه کرد که پتانسیل استفاده در شیمی درمانی سرطان را دارند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب شماره 9 نسبت به داروی اصلی عملکرد قوی تری دارد که مبین این گفته میزان IC_{50} کمتر آن نسبت به داروی اصلی است، که در ساخت داروهای شیمی درمانی می تواند مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه نهایت تشکر را دارند. این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است که محققان تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم اعلام می دارند. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکتری عمومی داروسازی خانم ملیکا امیرزاده به شماره 514 می باشد.

ترکیب شماره 9 می باشد، که دارای استخلاف اکسیم و فنیل روی زنجیره کربنی متصل به N، و استخلاف برم در موقعیت های 5 و 7 است (IC_{50}). ترکیب شماره 9 روی سلول های سرطانی HepG2 برابر 1/194، و روی سلول های سرطانی HeLa برابر 0/025 است. Matesic و همکارانش نیز در مطالعه ای که بر روی مشتقات 5 و 7-دی برموایزاتین انجام دادند، ترکیباتی مشابه ترکیب 9 را سنتز کردند، که نتایج آن به شرح زیر است:



سایتو توکسیسیته ترکیب 4a، که در مقایسه با ترکیب شماره 9، فاقد گروه اکسیم است بر روی رده های سلولی U937، Jurkat، و MDA-MB 231 مورد ارزیابی قرار گرفت که به ترتیب دارای IC_{50} 0,78، 1,52 و 4,35 بود.

هم چنین سایتو توکسیسیته ترکیب 6a که بجای استخلاف اکسیم در ترکیب شماره 9 دارای استخلاف کربونیل است، سمیت اش بر روی رده سلولی U937 مورد ارزیابی قرار گرفت که دارای IC_{50} 9,97 بود (15).

در ضمن نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که مشتق شماره 9، که توسط دکتر امامی و همکارانش سنتز شده بود، بر روی رده های سلولی HepG2 و

References

1. Freeman DL. Harrison's principles of internal medicine. JAMA. 2001;286(8):971-972.
2. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th ed Philadelphia; Saunders; 2015.
3. Leblanc M, Fagnou K. Allocolchicinoid synthesis via direct arylation. Org Lett. 2005;7(14):2849-2852.
4. Brown T, Holt Jr H, Lee M. Synthesis of biologically active heterocyclic stilbene and chalcone analogs of combretastatin. Heterocycl Chem. 2006;2:1-51.
5. Pandeya SN, Smitha S, Jyoti M, Sridhar SK. Biological activities of isatin and its derivatives. Acta Pharm. 2005;55(1):27-46.
6. Vine KL, Matesic L, Locke JM, Ranson M, Skropeta D. Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008. Anticancer Agents Med Chem. 2009 ;9(4):397-414.
7. Patel A, Bari S, Talele G, Patel J, Sarangapani M. Synthesis and antimicrobial activity of some new isatin derivatives. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010;5(4):249-254.(Persian).
8. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. Curr Med Chem Anticancer Agents.. 2002;2(1):1-7.
9. Emami S, Raeesi M. Synthesis of Ciprofloxacin-Isatin Conjugates as Potential Cytotoxic Agents. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2016 Jul 15;26(138):161-9.
10. Ahar R, Abnosi M, Mahdiyeh M, Amirjani M. Study of viability and activity of antioxidant enzymes in *Catharanthus roseus* L. under the treatment of different concentration of sodium nitroprusside in culture media. jppf. 2015; 3 (9):111-122.(Persian)
11. Tyagi N, Sharma G, Hooda, V, Phytochemical and pharmacological profile of *lagenariasiceraria*. IRJP.2012; 3(3):1-4.
12. Ghosh K, Chandra K, Ojha AK, Sarkar S, Islam SS. Structural identification and cytotoxic activity of a polysaccharide from the fruits of *Lagenariasiceraria* (Lau). Carbohydr Res. 2009;344(5):693-698.
13. Shokrzadeh M, Saravi SS, Mirzayi M. Cytotoxic effects of ethyl acetate extract of *Sambucusebulus* compared with etoposide on normal and cancer cell lines. Pharmacogn Mag. 2009;5(20):316.(Persian)
14. Shokrzadeh M, Chabra A, Naghshvar F, Ahmadi A. The mitigating effect of *Citrulluscolocynthis* (L.) fruit extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. Scientific World Journal.2013;2013 :980480.
15. Matesic L, Locke JM, Bremner JB, Pyne SG, Skropeta D, Ranson M, Vine KL. N-phenethyl and N-naphthylmethylisatins and analogues as in vitro cytotoxic agents. Bioorg Med Chem. 2008;16(6):3118-3124.