مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه اثرات بیولوژیکی مشتقات جدید H4-کرومن 3-کربونیتریل بر رشد رده سلول سرطان پستان انسانی T47D در حالت In vitro

زهرا صفاری[۱]، حسن آریاپور[۲]، علیرضا فرومدی[۳]، عظیم اکبرزاده[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کردستان، گروه بیوشیمی، کردستان، ایران.
[۲]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.
[۳]استاد، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۴]استاد، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یک مسئله با اهمیت در طب امروزی است و شایع ترین علت مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی عروقی میباشد. در این میان سرطان سینه یکی از شایع ترین علل مرگ ناشی از سرطان در بین زنان است به طوری که ۱/۵٪ از کل مرگ و میرها را تشکیل میدهد. لذا داروهای شیمیدرمانی که هدفشان از یک جهت جلوگیری از تکثیر بی رویه سلولها در بافتهای مشخصی از اندام بدن و از طرف دیگر القاء آپوپتوزیس در سلولهای توموری است از کاندیداهای مهم در درمان سرطان محسوب میشوند. ترکیبات سنتزی مورد استفاده، مشتقات H۴-کرومن ۳-کربونیتریل هستند که این ترکیبات بر روی سلولهای سرطانی مقاوم شده به داروهای دیگر چون Paclitaxel، مؤثرند. این ترکیبات با توجه به نقش القاکنندگی آپوپتوزی می توانند به عنوان عوامل درمانی جدید ضد سرطانی استفاده شوند. بدین ترتیب اثر سیتوتوکسیسیته و القاء آپوپتوزیس ترکیبات سنتزی H۴-کرومن ۳-کربونیتریل بررسی گردید.

مواد و روش ها: اثر سیتوتوکسیسیته سلولی ترکیبات سنتزی H۴-کرومن ۳-کربونیتریل با روش MTT بر روی رده سلولی سرطان سینه (T۴۷D) بررسی گردید. در نهایت برای ارزیابی اثر ترکیبات بر روی فرآیند آپوپتوزیس، از روشهای رنگ آمیزی با آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید و رنگ هوخست ۳۳۲۵۸، بوسیله میکروسکوپ فلوئورسنت و روش قطعه قطعه شدن DNA با روش دی فنیل آمین استفاده شد.

یافته ها: نتایج این بررسی نشان داد که مشتقات سنتز شدهای که دارای دو گروه شیمیایی NH_2 یا حاوی گروه OH در حلقه بنزنی خود بودند، اثر سیتوتوکسیسیته سلولی بهتری از خود نشان دادند و اثر القاء آپوپتوزیس با بهترین نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه گیری: جابه جایی گروه شیمیایی NO_2 روی حلقه تیول و قرار دادن گروه های شیمیایی مختلف روی حلقه بنزنیH۴–کرومن ۳-کربونیتریل باعث تغییر اثر سیتوتوکسیسیته ترکیبات گشته و بدین ترتیب مشتق سنتز شدهای که حاوی دو گروه شیمیاییNH_2 میباشد اثر سیتوتوکسیسیته شدیدتری داشته و برای بررسی اثر القاء آپوپتوزیس ناشی از ترکیبات فوق از این ترکیب استفاده گردید که نتایج مطلوبی را نشان داد.

کلمات کلیدی: مشتقات H۴–کرومن ۳-کربونیتریل، رده سلولی T۴۷D، آپوپتوزیس، سرطان سینه

مقدمه

امروزه سرطان دومین عامل مرگ و میر انسانها در جوامع بشری است. اگر دسته ای از سلول ها به علت عدم توانایی در حذف خودشان دچار تکثیر بی رویه شوند، سرطان ایجاد میشود. سرطان زمانی شروع میشود که سلولها در ژنهای کنترل کننده رشد دچار جهش میشوند. در حالتهای طبیعی سلول اگر دچار جهش جبران ناپذیر شود، خودش را میکشد ولی اگر نتواند خود را بکشد، این سلولها و یا اولاد و دودمان آنها ممکن است به شکل غیر قابل کنترل شدهای با اطلاعات ژنتیکی غلط تقسیم شوند (۲). سرطان سینه در کل جهان پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه، معده، کبد و کولون است. سرطان

آدرس نویسنده مسئول : تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانو بیوتکنولوژی
Email :azimakbarzadeh1326@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۰۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

سینه بیماری چند عاملی و پیچیده‌ای است که فاکتورهای ژنتیکی و محیطی زیادی در آن دخالت دارند. به هر عاملی که احتمال ابتلا به یک بیماری نظیر سرطان را افزایش دهد عامل خطر گویند. این عوامل خطر شامل سن، جنس، سابقه خانوادگی، چاقی، رژیم غذایی، نژاد، سن یائسگی، مصرف سیگار و الکل می باشند. با وجودی که عوامل خطر متعددی در بروز سرطان سینه شناخته و معرفی شده‌اند، ولی علت شناسی دقیق و قطعی آن هنوز مشخص نیست (۱،۲۲). راه های درمانی سرطان شامل جراحی، رادیودرمانی، شیمیدرمانی و هورموندرمانی و درمانهای زیستی می باشد (۴). اگر چه داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی در حال حاضر یکی از مؤثرترین روش ها برای درمان سرطان میباشد ولی اثرات سمیت شیمی درمانی سبب ایجاد اثرات جانبی میگردد. از جمله این اثرات، آسیب رساندن به بافت های کبد و کلیه، سرکوب سیستم ایمنی، استفراغ، ریزش مو، کم خونی و بیماریهای گوارشی میباشد. بنابراین آسیب بافتهای طبیعی توسط داروهای ضد توموری یکی از مهمترین محدودیت-ها برای افراد مبتلا به سرطان میباشد (۱۳،۲۳). پیدایش سلول-های توموری مقاوم به داروهای مرسوم شیمیدرمانی، استفاده از داروهای جدیدتری را موجب میگردد. بنزو پیرانها (کرومن-ها) از خانواده فلاوونوئیدها گروهی از ترکیبات طبیعی هستند که فعالیتهای بیولوژیکی متعددی دارند که شامل خواص آنتی توموری، اثرات ضد لیشمانیایی و ضد باکتریایی است. این اثرات موجب شده که این ترکیبات جهت مشتق سازی و غربالگری به عنوان عوامل جدید درمانی مورد توجه قرار گیرند (۱۴،۲۰) این ترکیبات با مهار تکثیر سلولی و برهمکنش با جایگاه کلشی سین در توبولین B باعث مهار پلیمریزاسیون میکروتوبولها گشته که منجر به توقف سیکل سلولی و در نهایت آپوپتوزیس می-گردد. این ترکیبات بر علیه برخی سلولهایی که مقاومت دارویی نشان میدهند مؤثر بوده و میتوانند در درمان بیماران سرطانی که مقاوم به عوامل آنتی توموری مثل تاکسانها هستند مفید باشند (۶). چون هنوز مکانیسم عمل این ترکیبات به طور کامل گزارش نشده است لذا مطالعات بیشتری بر روی مکانیسم و اثرات این ترکیبات به منظور یافتن ترکیبات ضد سرطان قویتر ضروری میباشد. با توجه به اینکه خاصیت ضد سرطانی این ترکیبات از طریق القاء آپوپتوزیس به اثبات رسیده تلاش برای سنتز مشتقات مختلف کرومن صورت گرفته است (۸،۱۰) آپوپتوزیس [۱] یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی یک پروسه تنظیم شده نرمال خودکشی سلولی است که موجود زنده را قادر میسازد تا تعداد سلولهای خو د را حفظ کرده و سلو لهای ناخواسته را که بقاء موجود را تهدید میکند حذف نماید. تعادل درست بین آپوپتوزیس و مهار آپوپتوزیس در حفظ هموستاز بافت و مورفوژنز اندام نقش مهمی دارد (۸،۱۶). در طی انجام آپوپتوزیس تغییرات بیوشیمیایی و سیتولوژیکی خاصی در سلول اتفاق میافتد که شامل متراکم سازی نوکلئوپلاسم و سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام آپوپتوزی متصل به غشا میباشد که توسط سلولهای مجاور شناخته شده و حذف میگردد (۹،۱۸). هر گونه اشتباه در این پروسه باعث به وجود آمدن حالت های پاتولوژیک میشود. از جمله انحراف از مسیر آپوپتوز باعث گسترش تومور و متاستاز شده و القاء آپوپتوز باعث ایجاد بیماری-های تحلیل اعصاب مثل الزایمر میگردد (۱۷،۱۹).

لذا در این مطالعه اثر سیتوتوکسیسیته و القاء آپوپتوزیس مشتقاتی از۴ H–کرومن ۳-کربونیتریل که در آزمایشگاه شیمی داروئی دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران سنتز شدهاند، مورد بررسی قرار داده شد.

مواد و روش ها

الف: تهیه ترکیبات

بخش تهیه و سنتز مشتقات کرومن در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، آزمایشگاه دکتر فرومدی انجام شده است (۷) نام آیوپاک و ساختار آنالوگ ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

ب: رده سلولی و نحوه کشت سلولی

رده سلولی بهکار برده شده در این مطالعه جهت ارزیابی اثرات سیتوتوکسیسیته مشتقات جدید کرومن - سلول T۴۷D با مشخصات Human ductal breast epithelial tumor cell line (NCBI C۲۰۳) میباشد، که از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شد. سلولها در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰۰ واحد در میلیلیتر استرپتو مایسین (برای جلوگیری از رشد باکتریهای گرم منفی) و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین (برای جلوگیری از رشد باکتری-

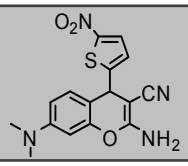
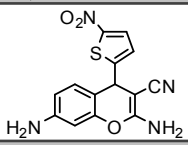
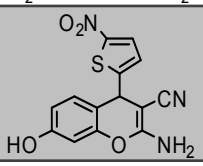
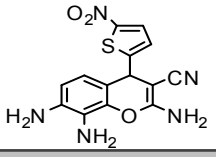
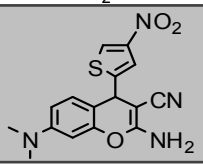
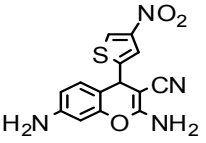
۱ Apoptosis

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

های گرم مثبت) کشت و پاساژ داده شدند. جهت جدا نمودن سلولها از کف فلاسک از محلول تریپسین–EDTA استفاده شد. شمارش سلول با هموسایتومتر انجام گردید. در تمامی تستها ابتدا درصد سلولهای زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۰٪ بود.

جدول۱: نام آیوپاک و ساختار آنالوگ های H۴-کرومن ۳-کربونیتریل

Compounds	IUPAC	Molecular formula	Molecular weigh	Structure
1	3-amino-9-dimethylamino-5-(5-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo [4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{16}H_{14}N_4O_3S$	342.37	
2	3,9-diamino-5-(5-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo[4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{14}H_{10}N_4O_3S$	314.32	
3	3-amino-9-hydroxy-5-(5-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo[4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{14}H_9N_3O_4S$	315.30	
4	3,9,10-triamino-5-(5-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo[4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{14}H_9N_3O_4S$	329.33	
5	3-amino-9-dimethylamino-5-(4-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo[4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{14}H_{10}N_4O_3S$	342.37	
6	3,9-diamino-5-(4-nitro-thiophen-2-yl)-2-oxa-bicyclo[4.4.0]deca-1(10),3,6,8-tetraene-4-carbonitrile	$C_{14}H_{10}N_4O_3S$	314.32	

ج: ارزیابی سیتوتوکسیسیته سلولی مشتقات کرومن

جهت سنجش اثر سیتوتوکسیسیته سلولی مشتقات کرومن از روش MTT assay استفاده شد. ابتدا ترکیبات کرومن در حلال DMSO حل و نگهداری شدند. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمونها ۰/۱ درصد بود. در این مطالعه از کشتهای سلولی در فاز رشد و تکثیر استفاده گردید. ابتدا صد میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ده هزار سلول در محیط کشت کامل به چاهکهای پلیت های ۹۶ حفرهای ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیونها در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و اتمسفر ۵٪ CO_2، ۱۰۰میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقتهای هر یک از مشتقات کرومن (۶۵۰-۱ میکرومولار) به چاهکها اضافه شد. هر رقت مشتقات دارویی در سه چاهک سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل به عنوان کنترل استفاده شد. پلیت به مدت۴۸ ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند. پس از پایان انکو باسیون ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر PBS) به تمامی چاهک ها افزوده شده و پلیت به مدت ۳ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستالهای رنگ فورمازان راسب شده در سیتوپلاسم سلولها با افزودن۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به هر چاهک حل شد. شدت رنگ با دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانو متر ثبت گردید.

IC_{50} (غلظتی از هر مشتق داروئی که ۵۰ درصد رشد سلول را نسبت به کشت کنترل کاهش دهد) بدست آمده از آزمون MTT و با کمک نرم افزارPharm-PCS statistical package (Springer-Verlag. New York) محاسبه گردید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

د: بررسی القاء آپوپتوزیس

برای بررسی اثر القاء آپوپتوزیس قویترین ترکیب (ترکیب ۴) انتخاب شد ، و به وسیله رنگهای فلوئورسنس (۳،۲۴) و روش قطعه قطعه شدن DNA (۵) مقدار آپوپتوزیس سنجش گردید.

۱- رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸

در ابتدا دو و نیم میلی لیتر سوسپانسیون سلولی معادل ده هزار سلول در هر خانه پلیت ۶ حفرهای به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس محیط کشت آنها تخلیه و سلولها با محیط کشت کامل حاوی رقت معادل $IC_{۵۰}$ از ترکیب ۴ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از پایان انکوباسیون مراحل زیر انجام گردید: لایه سلولی بعد از تخلیه کامل محیط کشت با PBS شستشو داده شد و پس از آن با پارافرمالدئید چهار درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس گردید. با خارج کردن پارافرمالدئید و شستشو با PBS، لایه سلولی با محلول رقیق شده رنگ هوخست ۳۳۲۵۸(۱ میلی گرم رنگ در ۱ میلی لیتر آب دو بار تقطیر) پوشانده شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در مکان تاریک، رنگ خارج و لایه سلولی با PBS شستشو داده شد و در نهایت با میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی و عکس برداری گردید.

۲- رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید

در ابتدا ۵ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی معادل بیست هزار سلول در هر فلاسک کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس محیط کشت آنها تخلیه و سلولها با محیط کشت کامل حاوی رقت معادل $IC_{۵۰}$ از ترکیب ۴ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از پایان انکوباسیون مراحل زیر انجام گردید: لایه سلولی بعد از تخلیه کامل محیط کشت تریپسینه شد و بعد از برداشت کامل سلولها سانتریفوژ گردید (g۲۰۰ به مدت ۳ دقیقه). سپس سوپرناتانت را خارج و سلولها با بافر PBS رقیق شد. سوسپانسیون سلولی با محلول رنگآمیزی(نسبت حجمی ۱:۱ از هر کدام از رنگها) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. نمونه بر روی لام گذاشته شد و در نهایت با میکروسکوپ فلورسنت مورد عکس برداری و بررسی قرار گرفت، البته برای تعیین درصد سلولهای آپوپتوزیس شده، ۴۰۰-۵۰۰ سلول شمارش شد.

۳- قطعه قطعه شدن DNA

برای تعیین درصد DNA قطعه قطعه شده از روش دی فنیل آمین استفاده گردید. ابتدا ۵ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی معادل بیست هزار سلول در هر فلاسک کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از تیمار نمودن سلولها با غلظت معادل $IC_{۵۰}$ بدست آمده از ترکیب ۴ به مدت ۲۴ ساعت، سلولها را از کف فلاسک جمعآوری و به ویال منتقل و سانتریفوژ (g۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد)گردید. محلول رویی دور ریخته شد و ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز سلولی (تریس باز + EDTA + تریتون X-۱۰۰)به رسوب سلولی اضافه و ورتکس گردید. با سانتریفوژ مجدد DNA قطعه قطعه شده از کروماتین دست نخورده جدا گردید. محلول رویی از رسوب جدا و در لوله A ریخته شد. ۰/۵ میلی لیتر از بافر لیز سلولی به رسوب اضافه گردید. (لوله B) ۰/۵ میلیلیتر تری کلرو استیک اسید(۲۵٪) به لوله A و B اضافه شد و پس از چند ثانیه ورتکس یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد از گذشت زمان DNA رسوب کرده و با سانتریفوژ جدا گردید. محلول رویی هر دو لوله A و B با دقت دور ریخته شد و ۸۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید(۵٪) به آنها اضافه گردید. در دو ویال تمیز به عنوان شاهد نیز ۸۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید(۵٪) ریخته شد. به منظور هیدرولیز DNA به مدت ۲۰ دقیقه نمونه ها در دمای ۸۳ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند و سپس ۱۶۰ میکرولیتر معرف دی فنیل آمین تازه به آنها اضافه و ورتکس گردید. نمونهها یک شب در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. در پایان جذب به کمک دستگاه الایزا و در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت شد و درصد DNA قطعه قطعه شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد قطعه قطعه شدن DNA} = \frac{\text{A تیپ OD}}{\text{B تیپ OD} + \text{A تیپ OD}} \times ۱۰۰$$

یافته ها

نتایج بررسی اثرات سیتوتوکسیک مشتقات H۴–کرومن ۳-کربونیتریل فوق در شکل ۱ نشان میدهند که با افزایش دوز داروها از ۱به ۶۵۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت توانایی زنده بودن سلولها نسبت به حالت کنترل شدیداً کاهش می یابد. همه ترکیبات دارای اثرات سیتوتوکسیک با $IC_{۵۰}$ کمتر از ۲۰۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

میکرومولار می باشند. با توجه به نتایج حاصل از شکل ۱، و محاسبه مقادیر IC_{50} میتوان قدرت نسبی ترکیبات را مقایسه کرد. مطابق جدول ۲ میزان IC_{50} ترکیب ۲، ۱۸۱/۲۶ میکرومولار گزارش شده است و لذا ضعیف ترین ترکیب مورد بررسی بوده است. ترکیبات ۳ و ۴اثرات قویتری داشتهاند بطوریکه IC_{50} معادل آنها به ترتیب ۸۹/۳۳ و ۸۱/۴۲ میکرومولار بوده است. ترکیب ۴ به عنوان قویترین ترکیب جهت مطالعات بعدی و بررسی اثر القاء آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بررسی اثر القاء آپوپتوزیس این مشتقات در تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلوئورسنت در اشکال ۲ و ۳ و قطعه قطعه شدن DNA در جدول ۲ نشان داده شده است.

تصاویر A (نمونه کنترل منفی) بدون اضافه نمودن ترکیب به محیط کشت سلولی و تصاویر B نشاندهنده اثر القاء آپوپتوزیس ترکیب ۴ در محیط کشت سلولی T۴۷D است.

شکل ۲ نتایج حاصل از رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ را نشان میدهد. در رنگ آمیزی با هوخست ۳۳۲۵۸ سلولهای نرمال به صورت آبی یکنواخت دیده میشوند، در حالیکه هسته سلولهای آپوپتوزیس شده، به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان دیده میشوند. رنگ هوخست ترجیحاً به نواحی غنی از A-T ملکول DNA متصل میشود پس همانطور که گفته شد رنگ آبی یکدست در نمونه کنترل منفی دیده میشود، در حالیکه هسته سلولهای آپوپتوز شده ناشی از تیمار با ترکیب ۴، به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان میباشند.

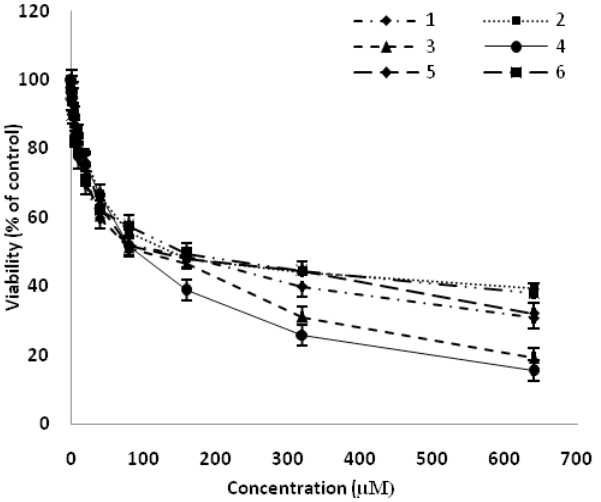
شکل ۳ نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید را نشان میدهد. سلولهای زنده در اثر رنگ آکریدین اورنج(AO) رنگ سبز یکنواخت گرفته و سلولهایی که مردهاند رنگ اتیدیوم بروماید(EtBr) را از خود عبور داده و بدین ترتیب رنگ نارنجی را به خود گرفتهاند.

یکی از شاخصههای شناخته شده سلولهای آپوپتوتیک قطعه قطعه شدن DNA به الیگونوکلئوزومها میباشد، در طی آپوپتوز سلولی، آنزیمهای اندونوکلئازی فعال شده و باعث تخریب DNA سلولی میگردد، که در مراحل آخر آپوپتوز روی میدهد.جدول ۳ نتایج حاصل از روش دی فنیل آمین را نشان میدهد. در نمونه کنترل درصد کم قطعه قطعه شدن را مشاهده کرده که می-تواند ناشی از خطا در مراحل آزمایش باشد در حالیکه در نمونه تیمار شده با ترکیب ۴ درصد قطعه قطعه شدن DNA به میزان ٪۳۴/۳ T۴۷D (نتیجه القاء آپوپتوزیس)، مشهود می باشد.

جدول۲: مقایسه قدرت فعالیت بیولوژیکی مشتقات ۴H – کرومن ۳- کربونیتریل بر روی ردهسلولی سرطان پستان انسانی T۴۷D در *In vitro*

Compounds	T47D IC_{50} (µM)±SE
۱	۱۰۷/۶۴±۸/۵
۲	۱۸۱/۲۶±۱۸/۴
۳	۸۹/۳۳±۵/۳
۴	۸۱/۴۲±۶/۱
۵	۱۲۳/۹۳±۷/۷
۶	۱۵۸/۹۳±۱۱/۶

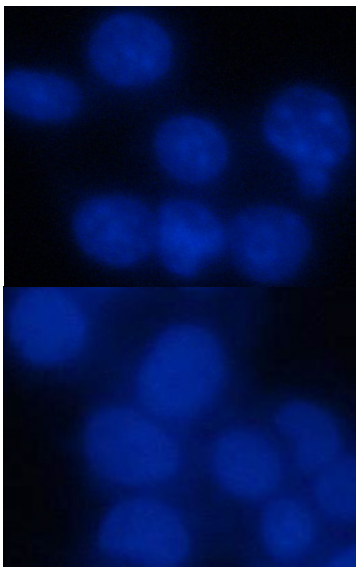
داده ها حاصل تکرار سه بار آزمایش است .p≤۰.۰۵



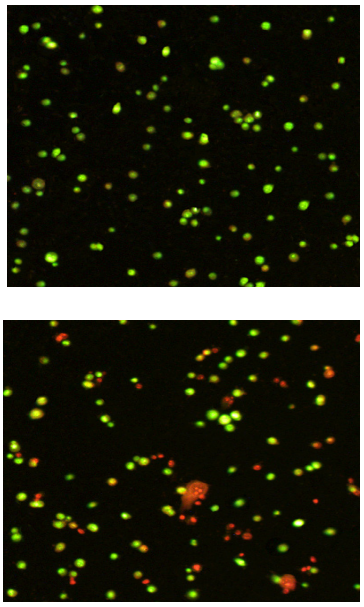
شکل۱: تاثیر ترکیبات ۱-۶ بر روی مهار رشد سلولهای T۴۷D. سلولها با دوزهای مختلفی از ترکیبات سنتزی برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد. p≤۰.۰۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]



شکل۲: تغییرات مرفولوژیکی القاء شده در هسته سلولهای T۴۷D در حضور و عدم حضور ترکیب ۴، که با هوخست ۳۳۲۵۸ رنگ آمیزی شدهاند. A: نمونه کنترل B: نمونه تیمار شده (بزرگنمایی ۴۰)



شکل۳: تصویر میکروسکوپ فلوئورسنت از سلولهای T۴۷D رنگ آمیزی شده با رنگ اتیدیوم بروماید-آکریدین اورنج. A: نمونه کنترل B: نمونه تیمار شده با ترکیب ۴ (بزرگنمایی ۵)

جدول۲: مقایسه درصد قطعه قطعه شدن DNA سلولهای T۴۷D تیمار شده با ترکیب ۴ و نمونه کنترل

Compounds	%DNA fragmentation
Control	**1.1**
Compound 4	**34.3**

بحث

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن بطور غیر عادی تقسیم و تکثیر شده و به بافت‌های سالم منتشر میشوند. بیشتر عوامل ضد سرطانی اثرات درمانی خودشان را با القای آپوپتوزیس اعمال میکنند. آپوپتوزیس یک مرحله متابولیکی مهم در تنظیم تعداد سلولها و رشد آنهاست. اگر آپوپتوزیس متوقف شود، متابولیسم مختل شده و تومور شکل گرفته و رشد میکند. القاء آپوپتوزیس یکی از مهمترین روشها در از بین بردن بدون عارضهٔ سلولهای سرطانی است (۱۱). در این تحقیق اثرات سیتوتوکسیک و القاء آپوپتوزیس مشتقاتی از ترکیبات کرومن سنتز شده مورد بررسی قرار داده شد. طبق مطالعات انجام یافته مشتقات دیگر این ترکیبات از طریق تداخل در تشکیل توبولین و یا ممانعت در پلیمرازسیون توبولین باعث القاء آپوپتوز در سلو لهای توموری میگردند (۶). لذا از آزمون MTT برای بررسی میزان حیات سلول و سنجش سمیت ترکیبات استفاده شد که در تحقیقات مشابه نیز این آزمون به عنوان یکی از پر کاربردترین روشهای سنجش میزان بقاء سلولی بوده است (۲۱). اثر القاء آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی DNA سلول با رنگهای آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید و رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ و قطعه قطعه شدن DNA با روش دی فنیل آمین پی گیری شد (۳، ۵، ۲۴) .رده سلولی T۴۷D که از نوع سلولهای اپیتلیالی چسبنده و دارای P۵۳ جهش یافته است، مورد استفاده قرار گرفت (۱۲) بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی اثرات سیتوتوکسیک، ترکیبات H۴- کرومن ۳-کربونیتریل که در رده سلولی T۴۷D در جدول ۱ مشاهده شد، تفاوت در نتایج به دلیل اختلاف در ساختار و وجود گروههای عاملی متفاوت در این ترکیبات، بارز گردید (۷).(جدول ۱) هر دو ترکیب از ۶ ترکیب دارای یک گروه یکسان و یک گروه عاملی متفاوت هستند که منجر به تفاوت در نتیجه تأثیر آنها بر روی سلولها گشته است.

تفاوت ترکیبات ۳ و۴ در گروه R متصل به حلقه بنزنی است که نتایج نشان میدهد داشتن دو گروه NH_2 در ترکیب ۴ تأثیر بسزایی در میزان اثر سیتوتوکسیک داشته است و بعد از آن ترکیب ۳ که دارای گروه OH میباشد بهترین نتیجه را نشان داده است. ترکیبات ۱ و ۵ در رده بعدی قرار گرفته اند. هر دو دارای گروه $N(CH_2)_2$ متصل به حلقه بنزنی هستند و تفاوت آنها

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

در موقعیت گروه NO_2 متصل به حلقه تیولی است. در ترکیب ۱ گروه NO_2 در حلقه تیولی در موقعیت ۵ و در ترکیب ۵ در موقعیت ۴ قرار داشته، لذا گروه NO_2 موجود در موقعیت ۵ نسبت به موقعیت ۴ نتیجه بهتری را نشان داد.

IC_{50} ترکیبات ۲ و ۶ بالاتر از ۱۵۰ میکرومولار شد که نتیجه ضعیفتری را نسبت به بقیه ترکیبات دارا بودند و اما از نظر موقعیت گروههای عاملی آنها، هر دو دارای گروه NH_2 متصل به حلقه بنزنی هستند و تفاوت آنها در موقعیت گروه NO_2 متصل به حلقه تیولی است. در ترکیب ۲ گروه NO_2 در موقعیت ۵ و در ترکیب ۶ در موقعیت ۴ قرار داشته که گروه NO_2 موجود در موقعیت ۴نسبت به موقعیت ۵ نتیجه بهتری را نشان داد.

با توجه به اطلاعات بدست آمده، وجود دو گروه شیمیایی NH_2 بر روی حلقه بنزنی ترکیب پایه باعث افزایش اثر سیتوتوکسیک ترکیب شده است و گروه OH، $N(CH_3)_2$ نیز به ترتیب در رده بعدی قرار داشتهاند. در حالیکه وجود یک گروه NH_2 باعث کاهش اثر ترکیبات گردیده است. نتایج بدست آمده از این ترکیبات نسبت به داروی سیس پلاتین که در حال حاضر به عنوان داروی شیمی درمانی مصرف میگردد- مقایسه گردید، IC_{50} ترکیبات نسبت به سیس پلاتین بیشتر بوده و لذا باید از تکنیکهایی در جهت بهبود نتایج استفاده کرد.

در نهایت برای تأیید القا آپوپتوزیس ترکیبات، از ترکیب ۴ استفاده شد که نتایج بدست آمده از رنگ آمیزیهای هوخست ۳۳۲۵۸ و آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید تأییدی بر القاء آپوپتوز توسط ترکیب مورد نظر بوده است. (شکل۲و۳)

اما درصد قطعه قطعه شدن DNA را نیز در رده سلولی مورد نظر شاهد بودیم. علت این امر کاهش بیان BCl-۲ در رده سلولی T۴۷D میباشد و از آنجائیکه بین بیان این فاکتور و آزادسازی سیتوکروم C ارتباط معکوس وجود دارد پس میتوان گفت با بیان پایین BCl-۲ در رده سلولی T۴۷D سیتوکروم C بیشتری آزاد گردیده (سیتوکروم C یک فاکتور ضروری برای شروع آپوپتوزیس است) که این باعث تشکیل آپوپتوزوم و در نتیجه باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و ۳ و در نهایت قطعه قطعه شدن DNA شده است. در نتیجه همه این عوامل باعث القای آپوپتوزیس در این رده میگردد(۱۵،۲۵).

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاران بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران سرکار خانم مریم فرحناک ضرابی، آقایان سهیل قاسمی، علی فرهنگی، محسن چیانی، حسن ابراهیمی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند و از سرکار خانم نجمه جعفری از دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران، که سنتز این ترکیبات را انجام دادند، قدردانی میگردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]

منابع

1. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. N Engl J Med, 2000; 342 (8):564-71.
2. Blagosklonny MV. A node between proliferation, apoptosis and growth arrest. Bioessays, 1999; 21 (8):704-9.
3. Byung KC, Chang HC, Hyun LO, Yong KK. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma Cells. NeuroToxicology, 2004; 25:915–924.
4. Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev, 2008; 34 (4):378-90.
5. Gibb RK, Gercl-Talor C. use of diphenylamine in the detection of apoptosis. Methods Mol Med, 2001; 39:679-80
6. Gordeau H, Leblond L, Hamelin B, Desputeau C, Dong K, Kianicka I, et al. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4-5-dimethoxyphenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. Mol Cancer Ther, 2004; 3 (11):1375-1383.
7. Jafari N. 1390. synthesis of novel 2-amino-3-cyano-4-(nitrothiophene)-benzopyran derivatives as potential anti cancer agents.
Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran University of Medical Sciences. (Persian in text full)
8. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Wang Y, Zhao J, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. J Med Chem, 2004; 47 (25):6299-310.
9. Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Jia S, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high through putscreening assay. 2. Structure-activity relationships of the 7- and 5-, 6-, 8-positions. Bioorg Med Chem Lett, 2005; 15 (21):4745-51.
10. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, et al. Discovery of 4-Aryl-4H-chromenes as a new series of Apoptosis Inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 3. Structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. J Med Chem, 2007; 50 (12):2858-64.
11. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer, 1994; 73 (8):2013-26.
12. Lamp SJ, Findlay DM, Moseley JM, Martin TJ. Calcitonin induction of a persistent activated state of adenylate cyclase in human breast cancer cells (T47D). J Biol chem. 1981; 256 (23):12269-12274.
13. Larsen ME, Rowntree J, Young AM, Pearson S, Smith J, Gibson OJ, et al. Chemotherapy side-effect management using mobile phones. Conf Proc IEEE Eng Med Biol. Soc, 2008; 5152-5.
14. Lee KY, Nam DH, Moon CS, Seo SH, Lee JY, Lee YS. Synthesis and anticancer activity of lavendustin A derivatives containing arylethenylchromone substituents. Eur J Med Chem, 2006; 41 (8): 991-6.
15. Mooney LM. Al-Sakkaf KA. Brown BL. Dobson PRM. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. Br J Cancer, 2002; 87:909-17.
16. O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. Curr Cancer Drug Targets, 2003; 3 (2):131-52.
17. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. J Clin Oncol, 1999; 17 (9):2941-53.
18. Reed JC, Tomaselli KJ. Drug discovery opportunities from apoptosis research. Curr Opin Biotechnol, 2000; 11 (6):586-92.
19. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. Brain Pathol, 2000; 10 (2):283-92.
20. Sairafianpour M, Kayser O, Christensen J, Asfa M, Witt M, Staerk D, et al. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of Smirnowia iranica. J Nat Prod, 2002; 65 (12): 1754-8.
21. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res, 1988; 48:4827-4833.
22. Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. Ann Surg, 2003; 237 (4):474-82.
23. Wang J, Chen B, Chen J, Cai X, Xia G, Liu R, et al. Synthesis and antitumor efficacy of daunorubicin-loaded magnetic nanoparticles. Int J Nanomedicine, 2011; 6:203-11.
24. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. INT Rev Cytol, 1980; 68:251-306
25. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cia J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. Science, 1997; 275 (5303):1129-32.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.6.1]