مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و ششم - بهار ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر سمیت ترکیب جدیدی از کرومن بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک (ATC)

سحر نوشاددل[۱]، محسن محمّدی[۱]* ، محمد هادی بهادری[۲]

۱ - دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از تهاجمی ترین نوع تومور بالینی اپیتیال و یکی از کشنده‌ترین تومورهای انسانی می‌باشد، که به طور معمول نسبت به شیمی درمانی‌های استاندارد مقاوم بوده است. کرومن یکی از داروهای ممتاز پزشکی می‌باشد که مشخص شده است که برخی از مشتق‌های طبیعی و مصنوعی آن دارای فعالیت بیولوژیکی مهم مانند ضد توموری، آنتی اکسیدانی، مهار کننده TNFα، و ضد التهاب و غیره می باشد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سمیت ترکیب جدیدی از کرومن بر روی رده سلولی سرطان آناپلاستیک تیروئید است. ترکیب سنتزی مورد استفاده (Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate) از خانواده ترکیب های کرومنی است. در این مطالعه اثر سمیت با استفاده از تست‌های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: اثر سمیت سلولی ترکیب با روش MTT بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک بررسی گردید. هم‌چنین برای ارزیابی اثر ترکیب بر روی فرایند آپوپتوزیس از روش‌های رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید به وسیله میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد. و در نهایت بررسی سمیت با سنجش میزان رهاسازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز مورد ارزیابی بیش‌تر قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این بررسی نشان داد که ترکیب سنتز شده اثر سمیت قابل توجهی به صورت وابسته به غلظت و زمان از خود نشان می دهد و باعث القاء آپوپتوزیس در این رده سلولی می‌شود.

نتیجه‌گیری: ترکیب ارزیابی شده به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مرگ سلول‌های سرطان تیروئید آناپلاستیک گردید. با توجه به نقش القاء کنندگی آپوپتوز، این ترکیب می‌تواند به عنوان عوامل درمانی جدید ضد سرطان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان تیروئید، رده سلولی ATC، کرومن، آپوپتوزیس، MTT

مقدمه

سرطان یکی از مشکل‌های بهداشتی عمده در جمعیت جهان و یکی از دلایل مهم مرگ و میر در سراسر دنیا می‌باشد که با وجود پیشرفت روزافزون در پیش‌گیری و درمان، سرطان هم‌چنان باعث مرگ و میر و ناتوانی بیماران می‌شود (۲۷،۳۷). سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن در یک تومور بدخیم به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر می‌شوند و بافت‌های سالم را نابود می‌کنند (۷،۱۶). علت این پدیده می‌تواند ژنتیکی یا عوامل بیرونی هم چون ویروس باشد (۳۴). راه‌های درمانی سرطان شامل جراحی، رادیو درمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و درمان های زیستی می‌باشد (۶). سرطان تیروئید شایع‌ترین تومور بدخیم غدد درون ریز می‌باشد و یک درصد از

نویسنده مسئول :
دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
پست الکترونیکی: mohammadi@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

تمام بیماری‌های بدخیم را شامل می‌شود و بروز آن هم چنان در حال افزایش می‌باشد (۴۱،۲۲). سرطان تیروئید شامل سرطان پاپیلاری (۷۵-۸۵٪)، سرطان فولیکولار (۱۰-۲۰٪)، سرطان مدولاری (۵٪) و سرطان آناپلاستیک (کم‌تر از ۵٪ موارد) می‌باشد (۲۳). سرطان تیروئید آناپلاستیک (ATC) یکی از تهاجمی‌ترین نوع تومور بالینی اپتیلیال و یکی از کشنده‌ترین تومورهای انسانی می‌باشد. این نوع سرطان کم‌تر از ۵ درصد از سرطان تیروئید بالینی و بیش از نیمی از سرطان‌های تیروئید را با میزان مرگ ۹۰ درصد از بیماران را تشکیل می‌دهد و متوسط زنده ماندن بیمار حدود ۶ ماه پس از تشخیص می‌باشد. این بیماری افراد سالمند با متوسط سنی ۶۰ سال را تحت تأثیر قرار می‌دهد که اغلب زنان می‌باشند (۸). سرطان تیروئید آناپلاستیک به عنوان یک توده بزرگ، نکروتیک و هموراژیک می‌باشد که به طور معمول به طور گسترده‌ایی قابلیت تهاجمی دارد و اغلب غده پارانشیم تیروئید با نفوذ به اطراف و در مجاورت بافت‌های نرم گردن مشخص می‌شود (۳۵). علائم در سرطان تیروئید آناپلاستیک با توده به سرعت در حال تحول مرکزی گردن (۷۷ درصد)، مشکل قابل توجه در بلعیدن (۴۰ درصد)، تغییر صدا (۴۰ درصد) و استریدور (۲۴ درصد) شروع می‌شود. علائم منطقه‌ایی نیز شامل یک توده قابل توجه غدد لنفاوی (۵۴ درصد) و درد گردن (۲۶ درصد) می‌باشد. علائم سیستمیک نیز شامل بی اشتهایی، کاهش وزن و تنگی نفس با متاستاز ریوی می‌باشد. ریه‌ها (۸۰ درصد)، استخوان‌ها (۶-۱۶ درصد) و مغز (۵-۱۳ درصد) از مکان‌های شایع متاستاز می‌باشند (۱۵). بیماران مبتلا به سرطان تیروئید آناپلاستیک، حتی در غیاب بیماری متاستاتیک، در زمان تشخیص دارای بیماری سیستمیک می‌باشند. پیشرفت‌های اخیر در فهم بیماری‌زایی ژنتیکی و مولکولی از سرطان تیروئید آناپلاستیک امید به درمان را برای این بیماری افزایش داده است ولی در هر حال سرطان تیروئید آناپلاستیک به طور معمول نسبت به شیمی درمانی‌های استاندارد مقاوم می باشد. درمان‌های چندگانه متشکل از عمل جراحی زمانی امکان پذیر است که با پرتو درمانی و شیمی درمانی در نظر گرفته شود (۳۰). پیدایش سلول‌های توموری مقاوم به داروهای مرسوم شیمی درمانی، استفاده از داروهای جدیدتری را موجب می‌گردد. کرومن (benzopyran) یکی از داروهای ممتاز پزشکی می‌باشد و به دلیل داشتن فعالیت های بیولوژیکی مورد توجه است. کرومن دارای حلقه هتروسیکلیک می‌باشد که متشکل از یک حلقه بنزن متصل به یک حلقه pyran است (۳۳). مشخص شده است که برخی از مشتق‌های طبیعی و مصنوعی کرومن دارای فعالیت بیولوژیکی مهم مانند ضد توموری (۱۷)، ضد میکروبی (۵)، آنتی اکسیدانی (۲۵)، مهار کننده TNF-α (۱۸)، ضد قارچ (۳۸)، ضد انعقاد، استروژنی (۲۹)، ضد ویروسی (۲۴)، ضد کرم، ضد سرطان (۱)، ضدHIV (۱۰)، ضد التهاب (۳۱)، کشنده گیاهان (۳۲)، ضد درد و ضد تشنج می‌باشد (۲). به علاوه ترکیب‌های کرومنی خواص سایتوتوکسیک شدید و همین طور توانایی مهار پلی‌مریزاسیون توبولین‌ها را نشان می‌دهند که مکانیسم اصلی عمل این دسته از ترکیب‌ها القاء آپوپتوز می‌باشد. این ترکیب‌ها و هم‌چنین مشتق‌های آن نمونه‌های بالینی بسیار خوبی برای درمان سرطان در انسان‌ها هستند. به علاوه ثابت شده است که تعدادی از این ترکیب‌ها را می‌توان به عنوان پیش دارو در نظر گرفت، که جزء عوامل شیمی درمانی برای هدف گیری رگ‌های توموری هستند و فعالیت ضد رگزایی دارند (۴۲). یکی از ویژگی‌های کلیدی این ترکیب‌ها این است که ماهیت چربی دوستی مشتق‌های benzopyran کمک می‌کند تا آن‌ها به راحتی از غشای سلولی عبور کنند (۲۸).

ترکیبی که در این مطالعه از آن استفاده شده است Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate یکی از مشتق‌های جدید این خانواده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سیتوتوکسیسیته و القاء آپوپتوزیس این ترکیب بر روی رده سلولی ATC می‌باشد.

روش کار

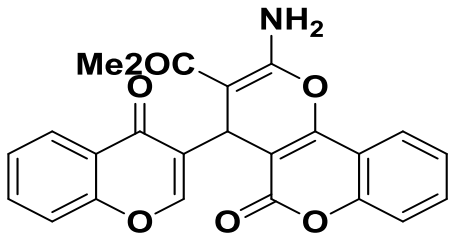
تهیه ترکیب

ترکیب Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate مطابق

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

روش دکتر بیژن زاده و همکارانش سنتز و تهیه شد (۳). شکل ۱



شکل۱: Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate (6d). Yield: 342 mg (82%). Colorless powder; m.p. 207-201 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 3245, 3333, 2367, 1732, 1637. ^{1}H-NMR (300MHz, DMSO-d_6): 3.65 (s, 3H, OCH_3); 4.43 (s, 1H, H-4); 7.36-7.42 (m, 2H, H-Ar); 7.47 (t, J = 7.65 Hz, 1H, H-Ar), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-Ar), 7.64-7.75 (m, 2H, H-Ar), 7.85 (s, 2H, NH_2), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-Ar), 7.98 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H-Ar), 8.40 (s, 1H, =CH); ^{13}C-NMR(75MHZ, DMSO-d_6) : 29.9; 50.6; 102.4; 113.1; 116.5; 118.3; 122.3; 122.4; 123.9; 124.5; 124.7; 125.2; 132.6; 133.8; 152.1; 154.7; 155.4; 155.5; 159.6; 159.9; 167.9; 175.6. HRMS (ESI): $C_{25}H_{16}NO_7$ $[M+H]^+$ found 418.09236, cal. 418.09242.

رده سلولی و نحوه کشت سلولی:

رده سلولی به کار برده شده در این مطالعه جهت ارزیابی اثرهای سیتوتوکسیسیته مشتق جدید کرومن، سلول ATC با مشخصه‌های Human anaplastic thyroid cancer line (NCBI ۸۳۰۵C) می‌باشد، که از بانک سلولی ایران (NABI) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰۰ واحد در میلی-لیتر استرپتومایسین (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی) و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت) کشت و پاساژ داده شدند. جهت جدا نمودن سلول‌ها از کف فلاسک از محلول تریپسین-EDTA استفاده شد. شمارش سلول‌ها با هموسایتومتر انجام گردید.

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته ترکیب کرومنی بر روی رده سلولی

جهت سنجش اثرسیتوتوکسیسیته مشتق کرومن از روش MTT assay استفاده شد. ابتدا ترکیب کرومن در حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل و نگهداری شد. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون‌ها ۰/۱ درصد بود. ابتدا ۲۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ۴ هزار سلول همراه با محیط کشت کامل به چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2، به پلیت‌های حاوی سلول و محیط کشت، غلظت‌های مختلف مشتق کرومن (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) اضافه شد.(حجم کل چاهک‌ها ۱۰۰ ماکرولیتر است). همه غلظت‌های مشتق کرومن در سه چاهک سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل به عنوان کنترل استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ۱۰ ماکرولیتر از محلول ۳-[۴،۵-دی متیل تیازول-۲-ایل]-۲،۵ دی فنیل تترازولیوم برمید(MTT) (۵ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و پلیت به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستال‌های رنگ فورمازان راسب شده در سیتوپلاسم سلول ها با افزودن ۱۰۰ ماکرولیتر ایزوپروپانول به هر چاهک حل شد. شدت رنگ با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده به ترتیب زیر محاسبه شد:

درصد فعالیت متابولیک=(جذب نوری سلول‌های تیمار شده)×۱۰۰/ (جذب نوری سلول‌های کنترل)

بررسی سیتوتوکسیسیته ترکیب کرومنی با سنجش میزان رهاسازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز به محیط کشت

سلول‌های ATC در ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای با غلظت‌های متفاوت از ترکیب کرومن (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

ساعت) تیمار شدند. سپس سلول‌ها جمع آوری و رسوب داده شدند. میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز(LDH) در محلول رویی و رسوب لیز شده سلولی اندازه گیری شد (کیت تشخیصی LDH پارس آزمون). درصد LDH رها شده از سلول به محیط کشت توسط فرمول زیر محاسبه می شود:

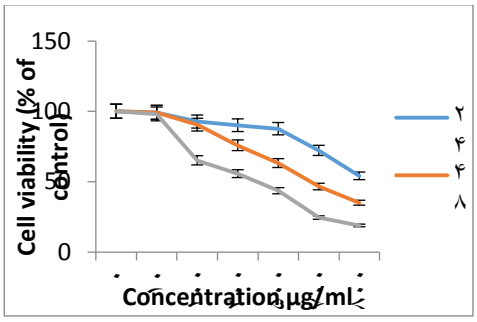
% LDH released = (LDH in culture medium / LDH in culture medium + LDH in cell lysates) × 100

بررسی القاء آپوپتوزیس توسط ترکیب کرومن در سلول-ها با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه

برای بررسی القاء آپوپتوزیس، مؤثرترین غلظت ترکیب کرومن (۲۰۰ µg/ml) انتخاب شد، و به وسیله رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید آپوپتوزیس سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ۵۰۰ ماکرولیتر سوسپانسیون سلولی معادل ۱۵هزار سلول در پلیت ۲۴ حفره ای به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس سلول‌ها با غلظتی از ترکیب کرومن معادل IC_{50} یعنی ۲۰۰ µg/ml به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد 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 سانتریفیوژ گردید (۱۲۰۰ g به مدت ۳ دقیقه) سپس سوپرناتانت را خارج و سلول‌ها با محیط کشت کامل رقیق شدند. ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۲۰ ماکرولیتر محلول آکریدین اورنج(AO) و اتیدیوم برماید(ETBR) (نسبت حجمی ۱:۱ هر کدام از رنگ‌ها) مخلوط و ۱۰ ماکرولیتر از آن را روی لام قرار داده شد. سلول-ها با لامل پوشانده و سپس با میکروسکوپ فلورسانس مورد عکس‌برداری و بررسی قرار گرفت.

نتایج

اثرهای غلظت‌های متفاوت ترکیب Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate بر روی رشد سلول‌های ATC با فاصله زمانی مختلف مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). نتایج بیانگر مرگ سلول های ATC بعد از تیمار با غلظت‌های متفاوت (۱۰-۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در زمان‌های مختلف (۲۴-۷۲ ساعت) می‌باشد. IC_{50} این ترکیب برای سلول‌های ATC بعد از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸۰۰ ، ۷۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. همان طوری که در شکل ۲ مشاهده می شود القاء مرگ سلولی توسط ترکیب کرومن در سلول‌های ATC بعد از ۲۴ ساعت به صورت وابسته به زمان افزایش می‌یابد و به طوری که در ۷۲ ساعت به بیش‌ترین میزان خود می‌رسد. به عنوان مثال در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت میزان زنده بودن سلول‌ها به ترتیب به میزان ۹۰/۱۰- ۷۵/۸۳- ۵۵/۶۶ سلول‌های کنترل می-رسد. این اثرها هم‌چنین به صورت وابسته به غلظت نیز بعد از ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت تیمار با ترکیب کرومن در غلظت‌های مختلف قابل مشاهده است. به طور کلی نتایج آزمون MTT نشان دهنده آن است ترکیب کرومنی سبب مرگ سلول های ATC می‌شود.



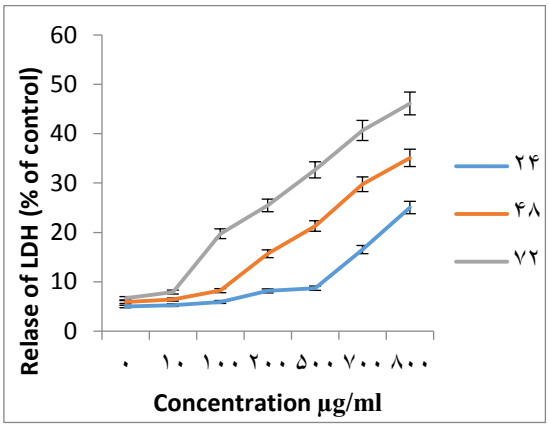
شکل۲: القا مرگ سلولی در سلول‌های ATC توسط ترکیب کرومن به صورت وابسته به غلظت و زمان. توانایی زنده ماندن سلول‌ها با کمک تست MTT بررسی شد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از ترکیب کرومن برای مدت زمان (۲۴)(۴۸)(۷۲) ساعت تیمار شدند. نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل می‌باشد.$P\leq$ ۰/۰۵

میزان رها سازی لاکتات دهیدروژناز(LDH) رده سلولی ATC تیمار شده با ترکیب کرومن در غلظت‌های متفاوت (۱۰-۸۰۰ µg/ml)، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج به صورت میانگین ۳ بار تکرار آزمایش‌ها می‌باشد.

درصد رها سازی LDH در سلول‌های تیمار شده با ترکیب کرومنی وابسته به غلظت و زمان بوده و با افزایش غلظت و

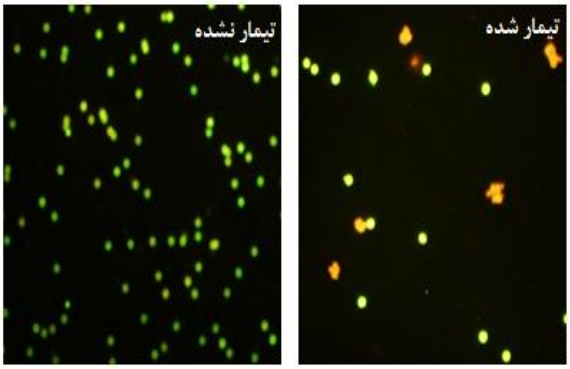
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

زمان بیش‌تر می‌شود. به طوری که بیش‌ترین درصد میزان رها سازی LDH در غلظت ۸۰۰µg/ml در مدت ۷۲ ساعت مشاهده گردید.



شکل۳: میزان رها سازی LDH در سلول‌های ATC تیمار شده با غلظت‌های مختلف ترکیب کرومن در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین ۳بار آزمایش مستقل می‌باشد. P≤۰/۰۵

برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا ترکیب کرومن سبب القاء مرگ از طریق آپوپتوز می‌شود از میکروسکوپ فلورسنت استفاده گردید. شکل ۴ نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید را نشان می‌دهد. سلول-های زنده در اثر رنگ آکریدین اورنج(AO) رنگ سبز یکنواخت گرفته و سلول‌هایی که در آنها آپوپتوز رخ داده است رنگ اتیدیوم برماید(ETBR) را از خود عبور داده و بدین ترتیب رنگ نارنجی را به خود می‌گیرند (۴۰).



شکل۴: القاء آپوپتوز در سلول‌های ATC تیمار شده با ترکیب کرومن بعد از ۷۲ ساعت. بعد از تیمار سلول با غلظت مشخص ترکیب کرومن به مدت ۷۲ ساعت، خصوصیات ظاهری آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و رنگ آمیزی AO/ETBR مورد بررسی قرار گرفت، الف) سلول‌های ATC تیمار نشده ب) سلول‌های ATC تیمار شده در غلظت IC_{50} (۲۰۰µg/ml) بعد از ۷۲ ساعت.

بحث

سرطان آناپلاستیک جزء سرطان‌های تیروئید نادر می‌باشد. این نوع سرطان ۲-۱ درصد از سرطان تیروئید بالینی را تشکیل می‌دهد (۲۶). این سرطان خیلی سریع در بدن پیشرفت می‌کند و درمان آن باید در سریع‌ترین حالت ممکن شروع گردد. راه‌های درمانی آن شامل جراحی، شیمی درمانی و پرتو درمانی می‌باشد ولی در اکثر موارد سرطان آناپلاستیک نسبت به شیمی درمانی مقاومت نشان می‌دهند (۳۹). اغلب داروهای شیمی درمانی با مهار تکثیر سلولی و پیش بردن سلول به سمت مرگ سلولی (آپوپتوز) فعالیت می‌کنند (۴،۱۳). از ترکیب‌هایی که فعالیت ضد سرطانی قوی داشته و با مهار تکثیر سلولی و برهم‌کنش با جایگاه کلشی سین در توبولین بتا (β) باعث مهار پلی‌مریزاسیون توبولین ها می‌شوند خانواده کرومن ها هستند. این ترکیب‌ها بر علیه برخی سلول-هایی که مقاومت دارویی نشان می‌دهند مؤثرند. کرومن‌ها ترکیب‌های ساده‌ای هستند که به گروه بزرگی از مولکول‌ها به نام مشتق‌های بنزوپیران که ترکیب‌های طبیعی هستند متعلقند (۱۹). کرومن و مشتق‌های آن به علت فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی به عنوان داروی ممتاز پزشکی شناخته شده‌اند (۳۶). بسیاری از ترکیب‌های طبیعی حاوی قسمتی از کرومن با فعالیت ضد سرطانی گزارش شده است لذا توسعه و طراحی چنین ترکیب‌هایی به عنوان ترکیب‌های بالقوه ضد سرطانی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (۱۲).

در این مطالعه ترکیب جدیدی از خانواده کرومن به نام Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate سنتز شده و اثرهای ضد سرطانی این ترکیب مورد بررسی قرار داده شد. این ترکیب به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب القا مرگ در سلول‌های سرطان تیروئید آناپلاستیک گردید. نتایج ارائه شده در (شکل۲) نشان می‌دهد که این ترکیب با غلظت‌های متفاوت در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث مهار رشد و مرگ سلول‌های ATC می‌شود. در مطالعه‌های گذشته در سال ۲۰۱۴ ، Keerthy و همکارانش مشتق هایی از ۲-آمینو-کرومن– نیتریل هایی را برای هدف قرار دادن Bcl2 در رده سلولی لوسمی میلوئیدی حاد سنتز و استفاده نمودند در این پژوهش ۲-آمینو-کرومن-۳-کربونیتریل‌ها سمیت سلولی را در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

این رده سلولی به نمایش گذاشتند. هم‌چنین ترکیبی از ۲-آمینو-۴ (۲و۶ دی کلروفنیل)-4H بنزوکرومن-۳-کربونیتریل کاهش رشد و افزایش آپوپتوز را در رده سلولی نشان داد (۲۰). همین طور Zonouzi و همکارانش در سال ۲۰۱۳، 2-amino-4- (nitroalkyl)-4H-chromene-3-carbonitriles را سنتز کرده و در مقایسه با داروی etoposide بر روی سه رده سلولی MCF-7 , MDA-231 و T47D مورد مطالعه قرار دادند که در نتیجهٔ آن تمام ترکیب ها فعالیت مهار رشد سلولی خوبی را نشان دادند که در مقایسه با داروی etoposide دارای اثر قوی‌تری بودند (۴۳). در تحقیق دیگر در سال ۲۰۰۴ توسط Gourdeau و همکارانش 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromene را بر روی رده سلولی Calu-6 سرطان ریه انسانی مورد مطالعه قرار دادند که شش ترکیب از این سری منجر به مهار پلی-مریزاسیون توبولین و در نهایت منجر به آپوپتوز شدند (۱۴). برای تأئید نتایج بدست آمده از تست MTT میزان لیز سلولی که نشان دهنده مرگ سلولی است با استفاده سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز مورد ارزیابی قرار گرفت. آنزیم لاکتات دهیدروژناز یکی از آنزیم‌های پایدار سیتوپلاسمی است که در اکثر سلول‌ها دیده می شود. این آنزیم به محض آسیب غشای سلولی به بیرون نشت می‌کند که با استفاده از کیت سنجش LDH قابل سنجش است (۱۱،۲۱). میزان رها سازی لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تیمار شده با ترکیب کرومنی به طور معنا داری با افزایش غلظت و گذشت زمان بیش‌تر گردیده است (شکل ۳). در توسعه داروهای شیمی درمانی ترکیب‌های دارای اهمیت هستند که باعث القاء آپوپتوز شوند نه این‌که مرگ سلولی از نوع نکروز را القاء نمایند، لذا در این مطالعه این موضوع مورد ارزیابی قرار گرفت که آیا ترکیب کرومنی چنین توانایی دارد که باعث القاء آپوپتوز در سلول های ATC شود. نتایج این پژوهش بر اساس بررسی مورفولوژیک نشان داد که تیمار سلول‌های ATC با ترکیب کرومنی باعث القاء شدید آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود. اثر القاء آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی DNA سلول با رنگ‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که دارو سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های ATC می‌شود. به طور کلی آپوپتوز بر اساس محرک یا القاء کنندهٔ آن از مسیرهای مختلفی به وقوع می‌پیوندد. امروزه دو مسیر اصلی القاء آپوپتوز شناسایی شده است، مسیر خارج سلولی و مسیر داخل سلولی که هر دو مسیر از طریق فعال شدن کاسپازها منجر به مرگ سلولی آپوپتوز می شوند (۹). آنچه اهمیت دارد این است ترکیب مورد مطالعه سبب القاء آپوپتوز در سلول های ATC می شود ولی نوع مسیر آپوپتوز اهمیت چندانی ندارد چون هر دو مسیر در نهایت باعث مرگ سلولی می شود. با توجه به تأثیرهای این ترکیب در القاء آپوپتوز، ممکن است اثر قابل توجهی در درمان سرطان تیروئید داشته باشد ولی برای چنین نتیجه گیری انجام آزمایش های تکمیلی به صورت In vivo مورد نیاز می باشد.

نتیجه گیری

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب Methyl 2-amino-5-oxo-4-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carboxylate یکی از ترکیب‌های خانواده کرومن‌ها به دلیل دارا بودن خاصیت سیتوتوکسیک و القاء آپوپتوزی به عنوان یکی از ترکیب‌های مناسب ضد سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این ترکیب بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک اثرهای آپوپتوزی شدیدی از خود نشان داد به طوری که این ترکیب در غلظت‌های ۸۰۰ ، ۷۰۰ و ۲۰۰ در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیش از ۵۰ درصد مرگ سلولی را افزایش داده است. به طور کلی با توجه به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان تیروئید آناپلاستیک توسط این ترکیب، ممکن است در آینده این ترکیب برای درمان ATC مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

تحقیق فوق با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و دانشگاه گیلان به اجرا درآمده است، بدین‌وسیله از آن واحدهای دانشگاهی، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

منابع

1. Aliaa MK, Manal MK, Eman K Abd El-all and Heba AH Elshemy. Design and synthesis of substituted chromenes as potential anticancer agents . IJPRD, 2012; 4(3): 310-322.
2. Bhat MA, Siddiqui N, Khan SA. Synthesis of novel 3-(4-acetyl-5H/methyl-5-substituted phenyl-4,5-dihydro-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2H-chromen-2-ones as potential anticonvulsant agents. Acta Pol Pharm, 2008; 65(2):235-39
3. Bijanzadeh HR, Mehrparvar S, Balalaie S. Efficient synthesis of chromonylpyrano[c]coumarin, chromonylbenzo[b]pyran, and pyrano[d]pyrimidine in aqueous media. Iranian Chemical Society, 2015; 12: 1859-1865(Persian in text full)
4. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia, 2003 ; 17(7)1211-1162
5. Chetan BS, Nimesh MS, Manish PP, Ranjan GP. Mirowave assisted synthesis of novel 4H-chromene derivatives bearing phenoxypyrazole and their antimicrobial activity assess . J Serb Chem Soc, 2012; 77:1-17
6. Coley HM . Mechanism and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic. Cancer Treat Rev, 2008; 34(4):378-90
7. Dick JE. Breast cancer cells revealed. Proc Nalt Acad Sci.U.S.A ,2003; 100:3547-3549
8. De Lellis RA, Loyd RV, Heits PU, end Eng C. 2004 . Pathology and genetic of endocrine organs. IARC,Lyon,France,2004.
9. Domingo PM and Steller H . Pathways regulating apoptosis during patterning and development . Current Opinion in Genetics&Development, 2007; 17:204-299
10. Denish CK, Hetal kp, Nilesh KG. Synthesis, characterization & anti-HIV activity of 4-Hydroxy-3-(5-methylisoxazol-3-yl) pyrano (3,2,c) chromene-2, 5-dione. AJBPR, 2012; 2(2):126-130
11. Decker T and Lohmann-Matthes ML. A quic and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measrements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods, 1988; Nov 25;115(1):61-9
12. El-Bayouki KH, mohammed Aly M, Mohamed Y, Basyouni WM, Abaas S. Novel 4(3H)-Quinazolinone contatining biologically active thiazole, 1,3-dithiazole , pyridine, chromene, pyrazolopyrimidinead pyranochromene of expected biological activity. World Journal of Chemistry, 2009; 4(2):161-179
13. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med,2003; 349(15):1451
14. Gourdeau H, Leblond L, Hamelin B, Despateau 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 a gents. Mol Cancer Ther, 2004; 3(11):1375-1383
15. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM and Mneck HR. A National cancer deta base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U,S 1985-1995.Cancer, 1988; Vol.83,no.12,pp:2638-2648
16. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. cell, 2000; 100:57-70

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

17. Henriette G, Lorraine L, Bettina H, Clemence D, Kelly Dong, Irenej K et al. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. Mol Cancer Ther, 2004; 3(11):1375-84
18. Jie-fei Cheng, Akiral Ishikawa, Yoshinori Ono, Thomas Arrhenius, Alex Nadzan. Novel chromene derivatives as TNF-α inhibitors, Bioorg Med Chem Lett, 2003; 13:3647-3650
19. Kemintzer W, Jiang S, Wang Y, et al. Discovery of 4-aryl-4h-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay.Part5: Modifications of the 2-and 3-positions. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008; 18:603-607
20. Keerthy H and et al. Synthesis and Characterization of Novel 2-Amino-Chromene-Nitriles that Target Bcl-2 in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. PLOS ONE, 2014; 9(9):1-11
21. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J Immunol Methods, 1983; Nov 25;64(3):313-20
22. Livolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. Modern Pathology, 2011; 24:1-9
23. Li M, Milas M, Nasr CH and et al. Anaplastic thyroid cancer in young patients: A contemporary review. American Journal of Otolaryngology, 2013; 34:636-640
24. Mori J, Iwashima M, Takeuchi M, Saito H. A synthetic study on antiviral and antioxidative chromene derivative. Chem Pharm Bull, 2006; 54(3):391-6
25. Milan M, Mirjana M, Desanka B, Sanja M, Neda N, Vladimir M et al. In vitro antioxidant of selected 4-Hydroxy-chromene-2one derivatives-SAR. QSAR and DFT studies. Int J Mol Sci, 2011; 12(5):2822-41
26. M.Lowe N, Loughran S, J.Slevin N, K.Yap B. Anaplastic thyroid cancer: the addition of systemic chemotherapy to radiotherapy led to an observed Improvementin survival-A single centre experience and Review of the literature. The Scientific Journal, 2014; 8 pages
27. Niknejed H, Yazdanpanah G, Khayat-khoei M. In vitro Evaluation of the Effects of Amniotic Membrane on Viability and Proliferation of Cancer Cells. ZUMS Journal, 2013; 21 (87) :13-21(Persian in text full)
28. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Roecker AJ, Cao GQ, Barluenga S, Mitchell HJ. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures . General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. J Am Cham Soc, 2000; 122:9939-9953
29. Nareshkumar Jain, Jiayi Xu, Ramesh MK, Fuyong DU, Guo Jian-Zhong, Emmanuel Pacia et al. Identification and structure-Activity relationships of chromene-derived selective estrogen receptor modulators for treatment of postmenopausal symptoms. J Med Chem, 2009; 52(23):7544-7569
30. Nagaiah G, Hossain A, J.Mooney C, Parmentier J, and C.Remick S. Analpastic thyroid cancer: A review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. Journal of Oncology, 2011; 1-3
31. Nimesh RK, Dhaval DH, Prashant TM, Saurabh KP. Synthesis and evaluation of in vitro antitubercular activity and antimicrobial activity of some novel 4H-chromeno[2,3-d]pyrimidine via 2-amino-4-phenyl-4H-chromene-3-carbonitriles. Med Chem Res, 2011; 20(7);854-867
32. Nitin K, Sushil K, Himanshu G, Sharma PK. 3-Hydroxy-2-(substituted phenyl)-4H-chromen-4-one derivatives-synthesis, spectral characterization and pharmacological screening. Wrjb, 2012; 1(1):1-5

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

33. Qiao Ren, Woon-Yew Siau, Zhiyun Du, Kun Zhang , Jian Wang. Expeditious assembly of a 2-Amino-4H-chromne skeleton by using an enantioselective mannich intramolecular ring cyclization-tatumerization cascade sequence. Chem Eur J, 2011; 17:7781-7785
34. Reya, T. et al. Stem cell, cancer, and cancer stem cells. Nature, 2001; 414:105-11
35. Ragazzi M, Ciarrocchi A, Valentina S, Gandolfi G, Bisagni A, and Piana S. Update on anaplastic thyroid carcinoma: Morphological, Molecular, and Genetic features of the most aggressive thyroid cancer. International Journal of Endocrinology, 2014; 1-13
36. Rupnar BD, Rokade B, Gaikwad PD, Pangrikar PP. Synthesis of 2-amino-4H-chromenes: Areview. Intemational Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS), 2014; Volum 2, 2320-4087
37. Sun Y, Liu M, Yang B, Lu J, Li B. Inhibition of laryngeal cancer cell invasion and growth with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human MMP-9 gene. Cancer Invest, 2008; 26(10):984-9
38. Suresh T, Arunima V, Atin K, Sandeep G, Prarthana VR, Ganesh RK. Novel chromeneimidazole derivatives as antifungal compounds: synthesis and in vitro evaluation. Acta Pol. Pharm, 2010; 67:423-427
39. Schlumberger MJ. 2004. Anaplastic thyroid carcinoma. Orphanet encyclopedia. http//www.orpha.net/data/patho/GB/UK-ATC.pdf
40. Saydam G, Aydin hh, Sahin F, Oktem G, Terzioglu E, Buyukkececi F and Omay SB. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon-alpha-2b-induced apoptosis in K562 human cheronic myelogenous leukemia cells. Leuk Res, 2003; 27.709-717.
41. Schweppe RE et al. Thyroid cancer cell lines: Critical models to study thyroid cancer biology and new therapeutic targets. Front Endocrinol *(*Lausanne*)*, 2012; 3: 81
42. Vosooghi M, Rajabalian S, Sorkhi M, Badinloo M, Nakhjiri M, Negahbani AS et al. Synthesis and cytotoxic activity of some 2-amino-4-aryl-3-cyano-7-(dimethylamino)-4H-chromenes. Res Pharm Sci,2010; 5(1):9-14
43. Zonouzi A , Mirzazadeh R and et al. 2-Amino-4-(nitroalkyl)-4H-chromene-3-carbonitriles as New Cytotoxic Agents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2013; 12(4) : 679-685

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.26.7.7]