Archive of SID

بررسی اثر سمیت سلولی مشتقات چالکون سنتتیک جدید بر رده سلول سرطانی Hela

باقر سید علیپور*[۱]، یگانه تقوی[۲]، محمدعلی خلیل زاده[۳]

۱) گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران
۲) گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، مازندران، ایران
۳) گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، مازندران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱٦

چکیده

مقدمه: فعالیت ضد سرطانی قوی چالکون ها و مشتقات آن قبلاً نشان داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سیتوتوکسیسیته چالکون سنتتیک جدید بر روی سلول های سرطانی Hela می باشد.

مواد و روش ها: سلول های Hela در محیط کشت مایع RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیر فعال شده و آنتی بیوتیک کشت گردیدند. سلول ها با غلظت های مختلف چالکون به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند و با استفاده از آزمون MTT بررسی شدند. آپوپتوز بر روی رده سلول های سرطانی Hela پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۴۰ µg/ml چالکون به روش میکروسکوپی بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS vol.19 و آزمون T-Test انجام شد.

یافته های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد که چالکون سنتتیک جدید در غلظـــــت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ µg/ml رشد سلول های سرطانی را به ترتیب ۶۳/۷۵، ۵۶/۵۸، ۵۴/۴۶، ۳۳/۶۰، ۱۸/۷۴، ۱۴/۹۶ بعد از ۷۲ ساعت مهار کرد. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۱۰µg/ml به میزان ۶۳/۷۵۶ بوده است. مقدار IC_{50} برای رده سلول های Hela، ۴۰ µg/ml به دست آمد. یافته های ما نشان داد بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول ها در غلظت های ۱۰ و ۲۰ µg/ml به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس تحقیق انجام شده، چالکون سنتتیک جدید دارای فعالیت ضد تکثیر در برابر سلول های سرطانی Hela می باشد. این فعالیت مرتبط با تاثیر ان بر چرخه سلولی به وسیله القاء فاز G2/M می باشد. مطالعات بیشتری در جهت مشخص ساختن مکانیسم مولکولی اثرات این چالکون جدید مورد نیاز است.

واژه های کلیدی: چالکون، سمیت سلولی، رده سلول سرطانی Hela، تست MTT

* **نویسنده مسئول:** گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

Email: b.seyedalipour@umz.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

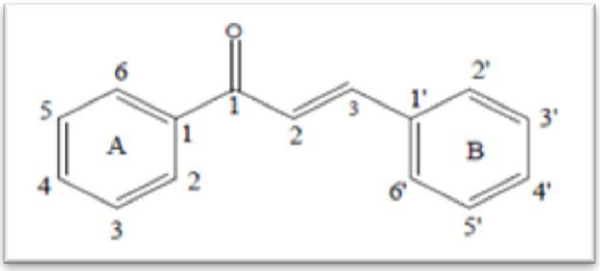
مقدمه

سرطان بیماری شایع و مزمن است که در اثر جا به جا شدن مکانیسم های حاکم بر تکثیر و تمایز سلول ها ایجاد می گردد. در واقع در حین سرطان، مرگ برنامه ریزی شده سلول ها در هم می ریزد و آپوپتوز اتفاق نمی افتد(۱). بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی بعد از بیماری های قلبی-عروقی، سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می شود که مرگ و میر بالایی را به خود اختصاص داده است. سرطان بیماری است که در نتیجه رشد و تکثیر بدون کنترل سلول ها ایجاد می شود سلول های سرطانی تومور را ایجاد می کنند که در بعضی موارد قابلیت تهاجم و متاستاز به سایر نقاط بدن را به دست می آورد(۱).

Hela یک نوع رده سلولی فناناپذیر مورد استفاده در تحقیقات علمی که به عنوان قدیمی ترین و شایع ترین رده مورد استفاده قرار می گیرد(۲). این رده سرطانی از سلول های گردن رحم خانم هنریتا لاکس گرفته شده که در نهایت به خاطر سرطان در ۴ اکتبر ۱۹۵۱ در گذشت. این رده سلولی بسیار با دوام و پرکاربرد است و بیشتر از رده های سلولی دیگر در تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرد(۳،۴). بنا بر این در مورد سرطان گردن رحم نیز همانند سایر سرطان ها، تلاش برای یافتن داروهای موثرتر و با عوارض جانبی کمتر ادامه دارد. در حال حاضر در درمان سرطان دارو قوی در دسترس نیست و داروها باعث عوارض جانبی در برخی موارد می شوند. در این زمینه، محصولات طبیعی به دست آمده از گیاهان دارویی در درمان سرطان اهمیت دارد.

درصد زیادی از جمعیت جهان در درجه اول آن دسته از کشورهای در حال توسعه به داروهای مشتق شده از گیاهان برای مراقبت های بهداشتی تکیه می کنند(۵). به همین دلیل محققان سراسر جهان تلاش های زیادی را جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی با خواص ضد سرطانی به کار گرفته اند. از جمله ترکیباتی که جهت درمان تومورها مورد توجه قرار گرفت، ترکیبات آلی هتروسایکلیک می باشند که دلیل توجه به این ترکیبات، وجود گروه های واکنش دهنده و خاصیت سیتوتوکسیک آن ها می باشد. اکثر این ترکیبات فعال، فلاونوئیدها، ایزوفلاون ها، فلاوون ها، آنتوسیانین ها، کاتشین ها و کومارینز آنتی می باشند(۶،۷). از چند دهه گذشته صعود ناگهانی برای جستجو داروهای مشتق شده از گیاهان جدید وجود دارد. در حال حاضر تولید قابل ملاحظه ای از محصولات طبیعی، حاوی داروهای مفید مشتق از ترپنوئید، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، پلی فنلیک ها، استروئیدها و غیره می باشند(۸).

چالکون ها جزء مشتقات(ترانس ۱ و ۳ دی آریل-۲ پروپن-۱ اون) می باشند(۹). همان طور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است چالکون ها، کتون های α و β غیر اشباع متشکل از دو حلقه آروماتیک(حلقه A و B) هستند. ساختار شیمیایی چالکون ها شامل دو حلقه آروماتیک متصل شده به کربن ۳، سیستم کربونیل α و β غیر اشباع بسیار الکتروفیلی است که ارتباط تنگاتنگ با ساختار خطی یا تقریباً مسطح دارد(۱۰،۱۱). آن ها شامل گروه ketoethylenic (-CO–CH=CH-) هستند(۱۲).



شکل شماره ۱. ساختار کلی چالکون

www.SID.ir

Archive of SID

چالکون ها دارای پیوندهای دوگانه کونژوگه و سیستم پای الکترونی غیر مستقر در هر دو حلقه بنزن هستند. چالکون ها پیش سازهای کلیدی در سنتز بسیاری از هتروسایکل های بیولوژیکی مهم مانند benzothiazepine، pyrazolines، 1-4-diketones و فلاوون هستند. چالکون ها و مشتقات آن ها با افزایش کاربردهای متعدد دارویی توجه را به خود جلب کرده اند. چالکون ها در گیاهان خوراکی فراوان هستند و پیش سازهای فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها در نظر گرفته می شوند(۱۳). مواد پلی فنولی در اکثر گیاهان وجود دارند و نشان داده شده است که فلاونوئیدها فعالیت ضد باکتری، ضد التهابی، ضد حساسیت، آنتی موتاژنیک، ضد ویروسی، ضد سرطان، ضد ترومبوتیک و گشادکنندگی عروق دارند(۱۴). چالکون ها که مشخصه اسکلت 1,3 diaryl-2-propen-1-one می باشند، عمدتاً در ریشه، ریزوم، ساقه، برگ و دانه از جنس گلپر، توت سفید، Sophora، Glycyrrhiza، Humulus، Scutellaria، Parartocarpus، Ficus، Dorstenia، Artocarpus و غیره پراکنده شده اند پیش ساز بیوسنتز فلاونوئید/ایزوفلاونوئید و پیش گیری کننده سرطان می باشند. در طول دهه گذشته، حدود ۹۰ ترکیب از چالکون ها با فعالیت های ضد تومور مختلف گزارش شده است. چالکون ها اثرات مختلف از جمله ضد متاستاز، القای آپوپتوز، ضد فلج و ضدرگ زایی دارند(۱۵). خصوصیات منحصر به فرد چالکون ها این است که باعث شروع اپوپتوز و اختلال در فاز میتوزی چرخه سلولی می شوند(۱۶).

در غشاء پلاسمایی اغلب سلول ها گیرنده های مرگ وجود دارد.. زمانی که این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می گردند. شناخته ترین گیرنده مرگ CD95/Fas/Apo1 می باشد. مطالعات You-Cheng و همکاران روی رده سلولی HSC-3 توسط چالکون Flavokawain نشان داد که با اتصال چالکون به گیرنده مرگ CD95/Fas/Apo1 و تحریک آن، باعث اتصال پروتئین های آداپتور FADD به آن می گردد. این پروتئن در ناحیه N ترمینال خودش با پروکاسپاز ۸ میان کنش می دهد و سبب فعال شدن پروکاسپاز ۸ می شود. سپس کاسپاز ۸ فعال شده سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی شده(کاسپاز ۳) و در نتیجه فرآیند آپوپتوز صورت می گیرد(۱۷).

بنا بر این نیاز به داروهای جدید همواره وجود داشته و محققان در سراسر جهان تلاش گسترده ای را در جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی با خواص ضد سرطانی معطوف داشته اند(۱۸). با توجه به اثرات چالکون ها بر سلول های سرطانی و اهمیت آن به عنوان دارو آنتی تومور، در این تحقیق اثر سمیت سلولی چالکون سنتیتیک جدید بر رده سلول های سرطانی Hela مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

ابتدا ۴ میلی گرم چالکون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop-2-en-1-one توسط ترازوی حساس دیجیتالی توزین گردید و در ۱۰۰ میلی لیتر حلال دی متیل سولفوکساید(DMSO) حل شد. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک های کشت سلول کمتر از یک درصد محاسبه گردید. در ضمن DMSO تا غلظت کمتر از یک در صد فاقد سمیت است و غلظت این حلال از این حیث مهم می باشد. سپس در محیط کشت سلولی (RPMI-1640) رقت های مختلف مورد نیاز تهیه شد. رقت های به کار رفته در این تحقیق شامل۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر می باشند. به منظور بررسی سمیت سلولی ترکیب فوق، تعداد ۸۰۰۰ سلول Hela در هر خانه فلاسک ۹۶ خانه ای در محیط کشت سلولی RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو کشت داده شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۰ درصد CO_2 انکوبه شدند. برای تعیین غلظتی از چالکون که باعث مرگ نیمی از سلول ها می شود IC_{50}، سلول های Hela با غلظت های متفاوتی از چالکون(۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ ، ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تیمار شده و هم چنین با میزان مشابهی

www.SID.ir

Archive of SID

از DMSO که جهت حل نمودن ترکیب مورد نظر استفاده شده بود، به عنوان کنترل تیمار شدند.

سنجش سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی: روش های متنوعی برای تخمین تعداد سلول بر اساس حضور یک آنزیم یا سوبسترای سلولی خاص یا جذب و سپس استخراج یک رنگ معرفی شده‌اند. در این آزمایش بررسی زنده بودن سلول ها توسط تست MTT (۵، ۴، ۳ دی متیل تیازول ۲ یل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم) در بازه زمانی ۷۲ ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت(۱۹). MTT افزوده شده به محیط کشت توسط فعالیت دهیدروژناز سلول های زنده به رنگ فورمازان تبدیل می شود. چون محتوای دهیدروژناز سلول های یک نوع نسبتاً ثابت است، میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول است. برای انجام تست MTT ابتدا محلول تترازولیوم با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و پس از فیلتره کردن به هر خانه از فلاسک ۹۶ خانه ای حجم ۲۰ میکرولیتر از آن اضافه و ۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، که طی آن از متابولیزه شدن ماده تترازولیوم در سلول های زنده بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل شدند، محتویات هر خانه با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین و به دنبال آن محلول های بنفش رنگی با شدت های رنگ گوناگون ایجاد شدند. میزان جذب نوری هر خانه، که معیاری از زنده ماندن سلول ها می باشند، با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید. چاهک های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان چگالی نوری کنترل و چاهک های بدون سلول و تنها محیط RPMI1640 به همراه سرم جنین گاوی به عنوان Blank در نظر گرفته شد. درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%OD = \frac{OD \text{ چاهک های تحت تاثیر عصاره} - OD \text{ بلانک}}{OD \text{ کنترل} - OD \text{ بلانک}} \times 100$$

با توجه به مقادیر جذب نوری به دست آمده به وسیله دستگاه الایزا ریدر درصد مهار رشد مربوط به هر غلظت با به کار گیری فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار رشد سلولی} = 100 - \frac{\text{میانگین درصد OD برای هرگروه تیمار}}{\text{میانگین درصد OD برای گروه کنترل}} \times 100$$

در نهایت داده ها پس از جمع آوری با استفاده از روش Students T-Test تجزیه و تحلیل شد. اختلاف در سطح احتمال معنی دار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

تعیین نوع مرگ سلولی از طریق رنگ آمیزی آکریدین اورنج/پروپریدیوم آیودا: ابتدا سوسپانسیون سلولی را تهیه کرده و در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای(در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی) کشت داده، و سپس انکوبه کرده بعد از ۲۴ ساعت چالکونی که بیشترین اثر مهاری را بر روی سلول های سرطانی داشت(غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) را به چاهک ها به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر اضافه کرده، یک ردیف از چاهک ها را به عنوان گروه کنترل انتخاب کرده تا بقیه چاهک ها با آن سنجیده شوند سلول ها به مدت ۲۴ ساعت با چالکون تیمار گشته، سپس محیط رویی را خارج کرده و حدود ۱۰۰

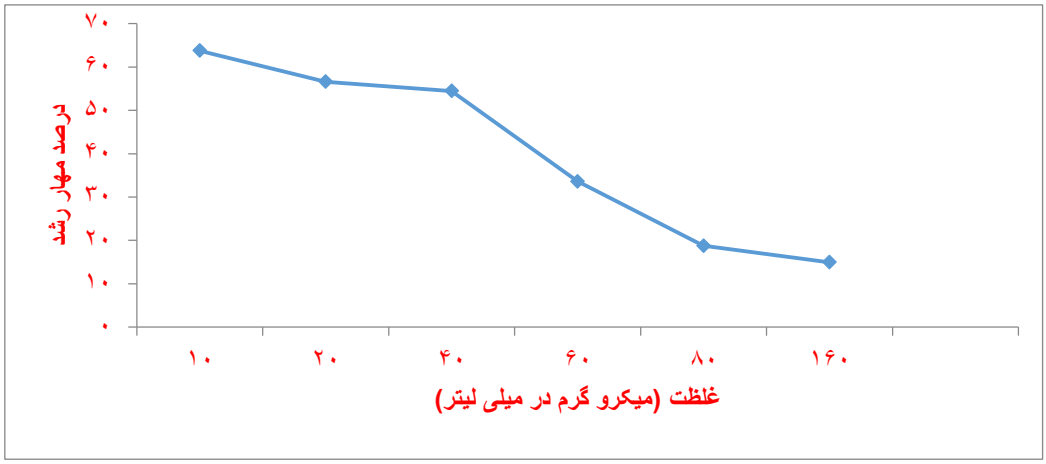
www.SID.ir

Archive of SID

میکرولیتر الکل ۹۵ درصد به چاهک ها اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده تا سلول ها فیکس شوند، بعد از ۳۰ دقیقه الکل را خارج نموده و با مخلوطی از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آکریدین اورنج(AO) و۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پروپریدیوم آیودا(PI) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط گشته، سپس رنگ را خارج کرده و با PBS (محلول بافر نمکی) شستشو شده و تحت بررسی با میکروسکوپ فلورسانس اولیمپوس معکوس با درشت نمایی ۲۰۰ مطالعه می شود.

یافته های پژوهش

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که چالکون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one بر روی رده سلول سرطانی Hela در غلظت های ۱۰ ، ۲۰ ، ۴۰ ، ۶۰ ، ۸۰ ، ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث مهار رشد این سلول ها به ترتیب به میزان ۶۳/۷۵، ۵۶/۵۸، ۵۴/۴۶۴، ۳۳/۶۰۳، ۱۸/۷۴، ۱۴/۹۶۸ شده است(نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱. درصد مهاری رشد سلول های سرطانی Hela در غلظت های مختلف چالکون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one **هر نقطه بیانگر** Mean±SD **است. تعداد تکرار برای هر غلظت سه بار می باشد.**

جدول شماره ۱. اثر غلظت های مختلف چالکون بر روی بر میزان جذب نوری و مهار رشد سلول های سرطانی Hela بر اساس روش MTT در مقایسه با گروه کنترل

غلظت چالکون(میکروگرم بر میلی لیتر)	جذب	درصد مهار	IC_{50}(میکروگرم بر میلی لیتر)
۱۰	۰/۲۳۴ ±۰/۰۴۹*	۶۳/۷۵	
۲۰	۰/۲۸۸±۰/۰۵۷*	۵۶/۵۸	
۴۰	۰/۲۹۸±۰/۰۶۲	۵۴/۴۶	
۶۰	۰/۴۱۵±۰/۰۶۵	۳۳/۶۰	۴۰
۸۰	۰/۴۷۲±۰/۰۴۳	۱۸/۷۴	
۱۶۰	۰/۵۱۰±۰/۰۷۲	۱۴/۹۶	
DMSO	۰/۲۹۶±۰/۰۲۰	۴۸/۸۸	
سلول نرمال(لنفوسیت و منوسیت)	۰/۶۱۲±۰/۱۱۰	۰/۹۳۷	
کنترل	۰/۵۰۹±۰/۰۰۸		

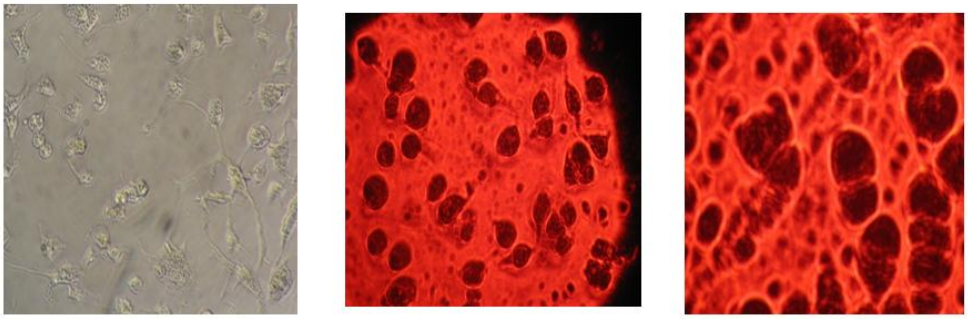
www.SID.ir

Archive of SID

جذب نوری خوانده شده در غلظت های مختلف دارای اختلاف معنی دار($P\leq0.05$) با گروه کنترل می باشد(جدول شماره ۱). هر عدد بیانگر میانگین به دست آمده به علاوه منهای خطای معیار مربوط به سه آزمایش می باشد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش Students T-Test انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفـاده از آزمـــون Students T-Test نشان داد که چالکون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one در غلظت ۲۰ و ۱۰ ($P\leq0.05$) بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول ها را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است(جدول شماره ۱).

نتایج مربوط به بررسی تغییرات ایجاد شده در سلول های سرطانی HeLa در طی آپوپتوز: سلول های سرطانی HeLa ابتدا کشت و پاساژ داده و سوسپانسیونی از این سلول ها با غلظت مشخص در محیط کشت تهیه شد. در غلظتی که بیشترین IC_{50} را داریم(۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) چالکون بر روی سوسپانسیون سلول های سرطانی اثر دادیم. تغییرات ایجاد شده در سلول در طی مرگ آپوپتیک با میکروسکوپ فلورسانس اولیمپوس معکوس با بزرگ نمایی ۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. آکریدین اورنج به تمامی سلول ها(مرده و زنده) نفوذ می کند. سلول هایی با هسته یکنواخت سلول های زنده هستند. در حالی که سلول هایی با کروماتین متراکم شده و یا قطعه قطعه شده، نمایانگر آپوپتوز می باشند.



شکل شماره ۱. مورفولوژی سلول های A Hela) **سلول های تیمار نشده** B**) سلول های تیمار شده با غلظت۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون** (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one **بعد از ٤ ساعت** C**) سلول های تیمار شده با غلظت ٤٠ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون بعد از ٢٤ ساعت. مطالعات مرفولوزیک نشان داد که بعد از ٢٤ ساعت مورفولوژی سلول ها تغییر کرده و سلول ها در مراحل انتهای آپوپتوز قرار دارند متراکم شدن مواد هسته ای و قطعه قطعه شدن کروماتین سلول ها مشاهده می شود. تغییرات ایجاد شده با میکروسکوپ فلورسانس اولیمپوس معکوس با بزرگ نمایی ۲۰۰ مطالعه شد.**

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

چالکون ها پیش سازهای کلیدی در سنتز بسیاری از هتروسایکل های بیولوژیکی مهم مانند benzothiazepine، pyrazolines1-4-diketones و فلاوون هستند. چالکون 1,3-diphenylpropen-1-ones متعلق به خانواده فلاونوئیدها می باشد که به طور وسیعی در سطح درمانی مختلف به ویژه به عنوان دارو آنتی تومور مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات نشان داد این چالکون با افزایش بیان مولکول های پیش اپوپتوزی روی چرخه سلولی تاثیر می گذارد و باعث مهار چرخه سلولی می شود(۲۰).

چالکون ها و مشتقات آن ها با افزایش کاربردهای متعدد دارویی توجه را به خود جلب کرده اند به منظور یافتن ترکیبات سنتزی ضد سرطان قوی و با عوارض جانبی ناچیز، در این تحقیق اثر کشندگی چالکون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one با غلظت های مختلف و بر روی سلول Hela مورد بررسی قرار دادیم. از آن جایی که برای حل کردن عصاره از DMSO استفاده شد از DMSO به عنوان کنترل منفی بر روی سلول Hela اثر داده شده است. نتایج نشان می دهد DMSO در غلظت به کاربرده شده، اثر معنی داری بر روی سلول Hela در مقابل کنترل نداشته است. هم چنین عصاره برروی سلول های سالم(لنفوسیت و منوسیت خون) اثر داده شده است.

سنجش MTT روشی ساده، سریع و پرکاربرد است که می توان با استفاده از آن به مقایسه میزان رشد دودمان های سلولی مختلف، شناخت و مقایسه عملکرد ترکیبات دارویی جدید و نیز به بررسی اثرات ترکیبی داروها با یکدیگر پرداخت. در مقابل عوامل گوناگونی بر صحت یافته های حاصل از انجام این تست تشخیصی اثر می گذارند. به عنوان مثال قرار دادن محلول MTT در معرض نور، خارج نمودن نامساوی محلول MTT از خانه های پلیت ۹۶ خانه ای و یا افزودن بیش از حد محلول DMSO می تواند در صحت نتایج حاصل از این تست اثرگذار باشند(۲۱). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که چالکون مورد نظر بر روی رده سلول سرطانی Hela در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد این سلول ها به ترتیب به میزان، ۶۳/۷۵، ۵۶/۵۸، ۵۴/۴۶۴، ۳۳/۶۰۳، ۱۸/۷۴، ۱۴/۹۶۸ شده است(نمودار شماره ۱). به طوری که بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به میزان ۶۳/۷۵۳ بوده است. هم چنین میزان IC_{50} به دست آمده برای سلول های Hela، ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شده است. نتایج نشان می دهد این ماده بر روی سلول های سالم(لنفوسیت و مونوسیت خون) در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثر داشته است.

Szliszka و همکاران چالکون های موجود در رژیم غذایی و اثرات ضد سرطانی آن ها را مورد بررسی قرار دادند. آن ها سمیت سلولی و اثر آپوپتوز ۵ چالکون را بر سلول های سرطان پروستات به وسیله آزمون MTT ارزیابی کرده اند. مطالعات نشان داد که ۵ چالکون تست شده: isobavachalcone, licochalcon A, chalcone, butein, xanthohumol، به طور مشخص دارای اثر آپوپتوز و سمیت سلولی در سلول های سرطان پروستات می باشند و نقش قابل توجه چالکون ها را به عنوان جلوگیری کننده شیمیایی سرطان پروستات مورد تایید قرار دادند(۲۲). مطالعات انجام شده نشان داد که ترکیبات 1,3-Diphenylpropenone و 3-(2-Hydroxyphenyl)-1-p-tolylpropenone منجر به آپوپتوز در سلول های MCF-7 از طریق مسیرهای درونی و هم بیرونی می شود(۲۳). هم چنین بررسی انجام شده نشان داد که چالکون 2',4'-dihydroxy-

www.SID.ir

Archive of SID

6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone منجر به القاء آپوپتوز در سلول هـــای ســـــرطانی HeLa و MCF-7 می شود(۲۴).

تشکیل کمپلکس بین Cdc2 (CDK-1) و سیکلین A/B1 واقعه مهم برای ورود سلول به میتوز می باشد(۲۵). چالکون FKB با مهار سیکلین A/B1 باعث کاهش فعالیت Cdc2 (mitotic-cyclin dependent kinase) و متـــعاقـــب آن کـــاهـــش فعالیت Cdc25C (mitotic phosphatase) و در نتیجه باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2/M در مسیر وابسته به دوز در رده سلولی HSC-3 می شود(۱۷). مرگ برنامه ریزی شده توسط ژن های خانواده Bcl-2 تنظیم می شود و این کار توسط کنترل رهاسازی سیتوکروم C انجام می گیرد(۲۶). اعضای این خانواده در تنظیم فعال سازی پروکاسپازها کمک می کنند(Bax, Bad) البته بعضی از این اجزا مثل Bcl-2 و Bcl-xl با ممانعت از رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری آپوپتوزیس را مهار می کنند(۲۷). چالکون ها علاوه بر توقف چرخه سلولی در مرز G2/M از طریق مسیر وابسته به میتوکندری باعث آپوپتوز می شوند. چالکون ها باعث کاهش شدید سطح Bcl-2 و متعاقب آن افزایش Bax در میتوکندری می شود. بنا بر این چالکون در مسیر وابسته به میتوکندری باعث آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری می گردد. سیتوکروم C آزاد شده از میتوکندری باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و آپوپتوز می شود. نتایج ما هم نشان داد این چالکون سنتتک در مسیر وابسته به دوز باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در رده سلولی Hela می شود.

مقایسه نتایج حاصل از تست MTT و رنگ آمیزی دوگانه نشان داد که غلظتی از چالکون که با درصد بالای مهار رشد همراه بود توانست در روش رنگ آمیزی دوگانه باعث القاء آپوپتوز در سلول های تحت تیمار شود و بعد از ۲۴ ساعت مورفولوژی سلول ها تغییر کرده متراکم شدن مواد هسته ای و قطعه قطعه شدن کروماتین سلول ها مشاهده شد. مطالعات مشتقات چالکون متوکسی و فلوئور بر روی سلول های ملانوما انسان(A375) نشان داد که باعث توقف چرخه سلولی در فاز S/G2/M بعد از ۲۴ ساعت و القاء آپوپتوز می شود(۲۸). در تحقیقی ترکیب 4-آمینو-5-برومو-2-کلرو-6-متیل پیریمیدین با استفاده از چندین واکنش شیمیایی سنتز گردید. بررسی های حاصل از انجام تست MTT نیز نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر سلولی ۷۲ ساعت پس از تیمار در سلول های TCC در غلظت ۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۴۸ ساعت پس از تیمار در سلول های سرطان مری در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. مشاهدات مورفولوژیک نشان دادند که سلول ها پس از تیمار در مقایسه با گروه کنترل و سلول های تیمار نشده به شکل کروی با سیتوپلاسمی گرانوله شده در آمده بودند(۲۹). بنا بر این در مطالعه حاضر پس از ۴ و ۲۴ ساعت تاثیر چالکون بر سلول سرطانی Hela، تغییرات مورفولوزیکی، متراکم و قطعه قطعه شدن کروماتین که نشان دهنده آپوپتیک است، مشاهده شده است. بر اساس یافته های حاصل از این پژوهش و مطابقت آن با نتایج محققان دیگر می توان بیان نمود که این چالکون سنتتیک جدید اثر مهارکنندگی بر رده سلولی Hela بوده و به طور مطلوبی منجر به القاء مرگ سلولی آپوپتوزی در این سلول ها گردیده است.

با توجه به نتایج این مطالعه می توان این چالکون را به عنوان ماده ای در نظر گرفت که دارای خاصیت کشندگی سلول های سرطانی می باشد و رشد این سلول ها را مهار می کند. برای نتیجه گیری قطعی انجام مطالعات بیشتر روی دیگر رده های سلولی ضروری می باشد. با مطالعات بیشتر احتمالاً می توان از آن به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی استفاده نمود.

سپاسگزاری

به این وسیله از کارشناس آزمایشگاه شیمی جناب آقای مجید قاسمی و کارشناس آزمایشگاه زیست سلولی و مولکولی سرکار خانم محمدی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می آید.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Anand P, Kunnumakkara AB, sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharma Res2008;25:2097-2116.

2. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. BioTechniques2009; 46 : 277–84.

3. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med 1953;97:695–710.

4.Capes A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Int. J Cancer2010; 127:1–8.

5. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27(1):1-93.

6. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J Clin Nutr2003;78:570–8.

7. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables. INT J FOOD SCI TECH 2002;37 :153–61.

8. Cragg M, Boyd MR. Drug discovery and development at the National Cancer Institute: the role of natural products of plant origin. in Medicinal Plant Resources of the Tropical Forest. Balick M J. Elisabetsky E. Columbia Uni Press NY USA1996;22: 101–36.

9.Motta LF, Gaudio AC, Takahata Y. Quantitative structure-activity relationships of a series of chalcone derivatives (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) as anti Plasmodium falciparum agents (Anti Malaria Agents). Electron J Mol Des 2006; 5:555-69.

10. Awasthi SK, Mishra N, Kumar B, Sharma M, Bhattacharya A, Mishra LC, Bhasin VK. Potent antimalarial activity of newly synthesized substituted chalcone analogs invitro. MED CHEM RES2009;18:407-20.

11. Lim SS, Kim HS, Lee DU. In vitro antimalarial activity of flavonoids and chalcones. Bull Korean Chem Soc 2007;28:2495-7.

12. Ilango K, Valentina P, Saluja G. Synthesis and invitro anticancer activity of some substituted chalcone derivatives. Res J pharm Biol Chem Sci 2010; 1:354-59.

13. Rahman A, Qureshi R, Kiran M, Ansari F L. Electron affinities, solvation energies and redox potentials of some chalcones substituents effect and correlation with semi empirical mo energies. Turk J Chem2007;31:25–34.

14. Alan L, Miller ND. Antioxidant flavonoids structure, functionand clinical usage. Alt Med Rev 1996;1:103-11.

15. Hui Zh, Feng W, Zhen G, Bin L. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. evid based complement. Alter Med 2013;11:81-9.

16. Edwards ML, stemerick Dm, sunkara PS. Chslcones: a new class of antimitotic agents. J Med Chem1990; 33:1948-54.

17. Hseu YC, Lee MS, Wu CR, Cho HJ, Lin KY, Lai GH, et al. The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. J Agric Food Chem2012;60:2385-97.

18. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Nat Acad Sci 1998; 95:15665–70.

19. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods1983; 65: 55-63.

20. Boumendjel A, Ronot X, Boutonnat J. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers potential anti cancer drugs? Curr Drug Targets 2009;10:363-71.

21.Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. The MTT assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). Allerg Immunol 1991;37:139-44.

22.Szliszka E, Czubaz P, Mazur B. Chalcones enhance TRAIL- induced

www.SID.ir

Archive of SID

apoptosis in prostate cancer cells. Int Mol Sci 2010; 11:1-13.
23. Syam S, Abdelwahab SI, Almamary M, Mohan S . Synthesis of chalcones with anticancer activities. Molecules 2012;17:6179-95.
24. Ye CL, Qian F, Wei DZ, Lu YH, Liu JW. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. Leuk Res2005; 29: 887-92.
25.Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle check points. Annu Rev Immunol Toxicol 1999; 39: 295−312.
26.Yang H L, Chen SC, Chen CS, Wang S Y, Hseu YC. Alpinia pricei rhizome extracts induce apoptosis of human carcinoma KB cells via a mitochondria-dependent apoptotic pathway. Food Chem Toxicol2008; 46:3318−24.
27.Gross A. Bcl-2 proteins regulators of the mitochondrial apoptotic program. IUBMB Life 2001;52:231−6.
28. Henmi K, Hiwatashi Y, Hikita E, Toyama N, Hirano T. Methoxy and fluoro-chalcone derivatives arrest cell cycle progression and induce apoptosis in human melanoma cell A375. Biol Pharm Bull 2009;32:1109-13.
29. Arghiani NM, Matin M, Bahrami AR, Behnamrasouli F, Rahimizadeh M, Shiri A, et al. Investigating the cytotoxic effects of a triazolopyrimidine derivative on carcinoma cells of the bladder and KYSE30. Biotchnology2011;19:61-7.

Investigating the Cytotoxic Effects of a New Synthetic Chalcone Derivative on HeLa Cell Line

*Seyedalipour B[*1], Taghavi Y[2], Khalilzadeh M[3]*

(Received: July 19, 2014 Accepted: September 7, 2014)

Abstract

Introduction: Chalcones and their derivatives have strong anti-cancer activity. The aim of present study was to evaluate the cytotoxicity effect of new synthetic chalcone on Hela cell line.

Material &methods: Hela cell line were cultured in RPMI1640 liquid medium along with with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Cells were cultured with various concentrations of chalcone for 72 hours and were analyzed by using the MTT test. Statistical analysis was performed by using of students T-Test. Apoptosis were examined on Hela cell lines after 24 hours in concentration of 40 µg/ml chalcone by Microscopic method.

Findings: The results of this study showed that new synthetic chalcone at concentrations of (10, 20, 40, 60, 80, 160 µg/ml) inhibit the growth of Hela cell line 63.75، 56.58،54.46،33.60،18.74،14.96 after 72 hours, respectively. The highest percentage of growth inhibition at a concentration of 10 µg/ml was 63.753. The IC50 value for Hela cells was 40 µg/ml. Our findings showed that grow the cells have reduced at concentrations of 10 and 20 µg/ml significantly compared to control group after 72 hours.

Discussion & Conclusion: Based on our research, synthetic chalcone has anti proliferation activity against HeLa cells lines. This activity is related to its effect on cell cycle by inducing G2 / M phase. Further studies are needed to demonstrate the molecular mechanisms of this new chalcone

Keywords: Chalcone, Cytotoxicity, HeLa cell lines, MTT test

1. Dept of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Mazandaran, Iran
2. Dept of t of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Mazandaran, Iran
3. Dept of Chemistry, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Mazandaran, Iran
**Corresponding author E mail: b.seyealipour@umz.ac.ir*

www.SID.ir