



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>



Research Article

Evaluation of the results of croman drug derivatives and their effect on colon cancer

Morvarid Moradi Haghghi^{a,*}, Reihaneh Sabbaghzadeh^{a,*}, Majid Momeni-Moghaddam^a, Behrooz Maleki^{b,*}

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

^bDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 01/Oct/2020

Revised: 02/Oct/2021

Accepted: 02/Oct/2021

Keywords:

Annexin-V, HT-29, Molecular modeling, Colon Cancer.

ABSTRACT

Cancer is a huge phenomenon in human society that it observe in developing countries and even more developed countries in terms of economic as well. Colon cancer is created by increasing cancer cells that its main reason is the uncontrollable growth of cells in Colon. In this research, two groups of stable chromene compounds which was calculated in the previous study using bioinformatics software selected and their toxicity effect and the kind of cell death that they cause investigated on HT-29 cancer cell line, which is related to colon cancer. Also, toxicity of 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-5-oxo-4H,5H-pyrano [2,3-c] chromene -2-carbonitrile (S1), 2-amino-4-(4-bromophenyl)-5-oxo-4H,5H-pyrano [2,3-c] chromene -2-carbonitrile (S2) which had an appropriate stable determined. At concentrations of 1, 2, 3, 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, a control group was performed on HT-29 cancer cell lines in comparison with the chemotherapeutic drug Campusar with similar concentrations of the chemotherapy drug using MTT assay. Analysis of data was done by statistical software Graphpad Prism 8 and ANOVA test and ultimately, the type of cell death which created by Flow cytometry technique was examined. The results showed that chromium derivatives by causing apoptosis in HT-29 cancer cells could be further studied as a suitable candidate for the effect on colon cancer.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.21263.1891>

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Associate Professor of Biochemistry. E-mail address: r.sabbaghzadeh@hsu.ac.ir & Professor of Organic Chemistry. E-mail address: b.maleki@umz.ac.ir

How to cite this article: Sabbaghzadeh, R., Moradi, M., Momeni-moghadam, M., & Maleki, B. (2023). Evaluation of the results of chromen drug derivatives and their effect on colon cancer. *Applied Chemistry*, 18(67), 181-194. (in persian)

بررسی نتایج حاصل از مشتقات دارویی کرومن و تاثیر آنها بر سرطان کولون

مروارید مرادی حقیقی^۱، ریحانه صباغ زاده^{۱*}، مجید مومنی مقدم^۱، بهروز ملکی^{۲*}

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

^۲گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۱۰ تاریخ تصحیح: ۰۰/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۷/۱۰

چکیده

سرطان یک عارضه بزرگ در جامعه انسانی است و در کشورهای کمتر و یا حتی بیشتر توسعه یافته از نظر اقتصادی نیز دیده می‌شود. سرطان کولون در اثر رشد سلول‌های سرطانی در روده بزرگ به وجود می‌آید که دلیل اصلی آن رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها در ناحیه مورد نظر است. در این تحقیق دو گروه از ترکیبات پایدار کرومنی مورد مطالعه با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی، انتخاب گردید و اثر سمیت آنها و نوع مرگ سلولی توسط آنها بر رده سلولی سرطانی HT-29 که مربوط به سرطان کولون می‌باشد، بررسی شد. همچنین، سمیت ۲-آمینو-۴-(۴-کلرو فنیل)-۵-اکسو-۴H-پیرانو [C-۲,۳] کرومن ۳-کربونیتریل (S1) و ۲-آمینو-۴-(۴-برومو فنیل)-۵-اکسو-۴H-پیرانو [C-۲,۳] کرومن ۳-کربونیتریل (S2) که پایداری مناسبی داشتند تعیین و در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و یک گروه کنترل بر روی رده های سلولی سرطانی HT-29 در مقایسه با داروی شیمی‌درمانی کمپتوسار با غلظت‌های مشابه داروی شیمی‌درمانی به کمک تست MTT مورد بررسی قرار گرفته اند. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماری 8 Graphpad Prism و آزمون ANOVA- دوطرفه انجام شد و در نهایت نوع مرگ سلولی ایجاد شده توسط تکنیک فلو سائتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که مشتقات کرومنی در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر با ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HT-29 می‌توانند به عنوان کاندیدای مناسبی جهت اثر بر سرطان کولون مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرند.

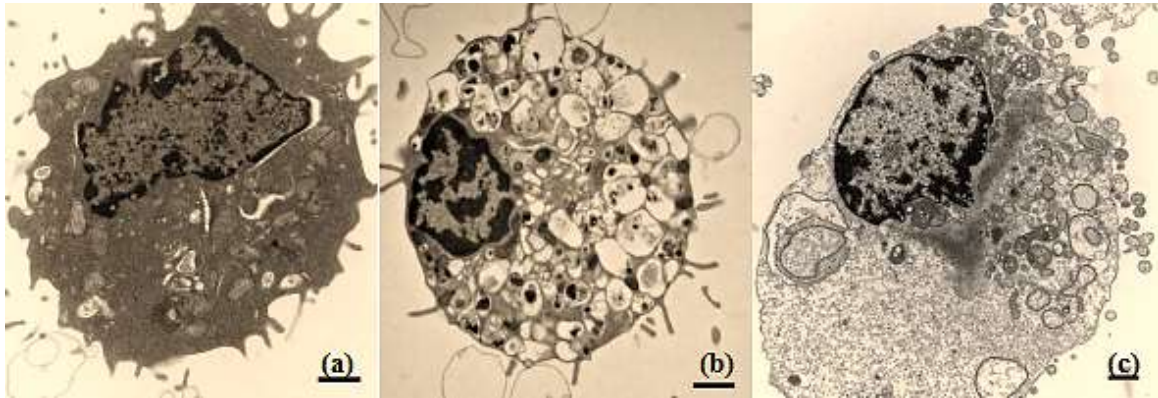
کلمات کلیدی: HT-29 Annexin-V، مولکولار مدلینگ، سرطان روده.

۱- مقدمه

سرطان کولون در اثر تکثیر سلول‌های سرطانی در روده بزرگ به وجود می‌آید. دلیل اصلی آن رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها در ناحیه مورد نظر است [۱]. در واقع شروع سرطان کولون اغلب به این صورت است که پولیپ‌هایی در سطح پوشش داخلی روده بزرگ ایجاد می‌شود که در ابتدا غیر سرطانی (آدنوما) هستند اما به مرور زمان اگر درمان نگردند، امکان دارد که سرطانی شوند [2]. این پولیپ‌ها هر چه به سمت پرزی شدن پیش می‌روند احتمال سرطانی شدن آنها نیز بیشتر می‌گردد، از این رو این پولیپ‌ها را پیش سرطانی نیز می‌نامند [3]. بر اساس گزارشات به دست آمده، یکی از شایع ترین سرطان‌ها در ایران، سرطان کولون است و میزان آن در مردان بیشتر از زنان است [4].

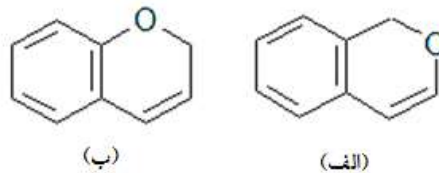
آپوپتوز یک فرآیند طبیعی سلولی است که به کمک آن میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن تنظیم می‌شود، به این عمل، مرگ برنامه ریزی شده سلولی هم گفته می‌شود. شناسایی و ردیابی این فرآیند سلولی و راه‌های کنترل آن برای دستیابی به داده‌های ضد سرطانی سودمند می‌باشد [5]. (شکل ۱). طی این فرایند، تشکیل اجسام آپوپتوتیک بدون ایجاد التهاب روی

می دهد. در حالی که نکروز مرگ در زمان آسیب زایی سلول بوده و در طی استرس‌های شدید به سلول همانند؛ سموم خارجی اتفاق می افتد و فرآیندی است که نیاز به مصرف انرژی ندارد. در نکروز سلول متورم و بزرگ شده، غشاء و اندامک‌های سیتوپلاسمی تخریب می شود و آزاد شدن محتویات درون سلولی همراه با واکنش‌های التهابی اتفاق می افتد [6].



شکل ۱. تفاوت‌های مورفولوژی آپوپتوز و نکروز سلول‌ها در قالب تصویر، (a): تصویر یک سلول نرمال، (b): تصویر سلولی که دچار آپوپتوز شده، (c): تصویر یک سلول نکروز شده [7]

کرومن‌ها دسته‌ای از ترکیبات هتروسیکلیک هستند که از اتصال حلقه بنزن به یک حلقه از پیران به وجود می‌آیند، از این رو با نام عمومی بنزوپیران‌ها نیز شناخته می‌شوند. بنزوپیران‌ها شامل دو رده اصلی (شکل ۲) می‌باشند [8].



شکل ۲. انواع بنزوپیران (الف: ۱- بنزوپیران، ب: ۲- بنزوپیران)

نمونه‌ای از مشتقات دارویی مربوط به خانواده کرومن‌ها که به نظر می‌رسد برای بررسی اثر بر روی سلول‌های سرطانی مناسب باشد، مشتقات بنزوپیرانو [C-۲،۳] کرومن ۶،۷ دی‌اون می‌باشد، که نتایج به‌دست آمده از اثر این ترکیبات بر روی رده‌های سلولی سرطانی MCF-7، Ls180 و HeLa نشان داد که این ترکیبات دارای فعالیت ضد سرطانی هستند که بسته به موقعیت استخلاف‌ها به خصوص در حالت متا و پارا این فعالیت بیشتر می‌شود [9].

همچنین در گزارش مشابهی در سال ۲۰۱۷ روی مشتقات کرومن انجام و اثر آن بر رده سلولهای MCF-7 (سرطان پستان)، HCT-116 (سرطان کولون) و HepG-2 (سرطان کبد) مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، وضعیت سمیت آنها با روشهای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و نتیجه به صورت اثر مهاری با حساسیت بیشتر در مورد HepG-2 تایید شد [۱۰]. کاربرد ضدسرطانی دیگری از مشتقات دارای هسته کرومنی، توسط مینا هنیغه و همکارانش در سال ۲۰۱۹ گزارش شده است.

در این تحقیق مشتقات ۳- آمینو-۱-آریل-1H-بنزو [f] کرومن-۲-کربونیتریل بوسیله واکنش سه جزئی از تراکم آریل های آلدئیدی، مالونیتریل و ۲-نفتول در حضور کاتالیزور جدید ۱و۴-بیس (۴-فروسنیل بوتیل)- پپرازین سنتز شدند و در نهایت از بین مشتقات کرومنی سنتز شده، ترکیب ۳-آمینو-۱-(۴-فلوروفنیل)-1H-بنزو [f] کرومن-۲-کربونیتریل دارای بیشترین فعالیت ضدسرطانی از بین سایر مشتقات سنتز شده از خود نشان دادند و در مطالعات آتی این مشتق مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی های انجام شده بر روی این مشتق کرومنی سنتز شده، ثابت شد که این ترکیب با افزایش نسبت Bax/Bcl در القا آپوپتوز در سلولهای سرطان کلورکتال HT-29 نقش داشتند که می تواند یک نامزد در پیشنهاد داروی ضد سرطان باشند [۱۱].

اخیرا، اثر مهارى مشتقات کرومن روی پروتئین Bcl-2 و القا آپوپتوزیز مورد بررسی قرار گرفته است و پیشنهاد دادند چون نقش آپوپتوزی دیده می شود، پس می توان انتظار ویژگی ضد سرطانی داشت چون کاسپازهای ۳/۷ را فعال می کند. در این بررسی ترکیب ۲-آمینو-۴-(۳-نیتروفنیل)-4H-بنزو [h] کرومن ۳-کربونیتریل با هسته کرومنی به عنوان یک عامل ضد رشد قوی برای بسیاری از انواع سلول اثبات شده که مهار کننده میتوز و میکروتوبولهاست [۱۲].

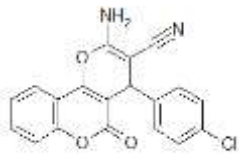
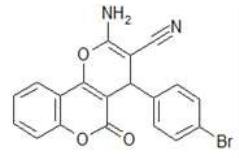
از آنجایی که سرطان به عنوان عارضه‌ای بزرگ در جوامع بشری شناخته شده است، راهکارهای درمانی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. به نظر می‌رسد با توجه به کارهای پژوهشی انجام شده بر روی ترکیبات شیمیایی خانواده کرومن، این ترکیبات بسته به میزان دوز مصرفی و مدت زمان تیمار (از طریق آپوپتوز و سایر موارد بر روی سلول‌های سرطانی)، اثر قابل مقایسه‌تری نسبت به برخی از داروهای ضد سرطانی از خود اعمال می کنند [13]. بر همین اساس در ادامه کارهای تحقیقاتی در شیمی در سنتز ترکیبات آلی متنوع با خواص بیولوژیکی [14-15]، در اینجا بررسی اثرات سمیت سلولی مشتقات کرومن انتخابی بر رده سلولی HT29 و در غلظتهای مختلف جهت جایگزینی با سلولهای سالم هدف دنبال شده در این مقاله مورد بررسی قرار می گیرد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده

داروی شیمی درمانی کمپتوسار از شرکت طب آزما، کیت MTT و محلول بافر فسفات سالین از شرکت نوآوران تکنولوژی زیستی و محلول دی متیل سولفوکسید از شرکت بتا ژن تهیه شد. در جدول ۱، مشتقات دارویی کرومن که مورد مطالعه قرار گرفتند، گردآوری شده است (S1, S2). این مشتقات کرومنی مطابق فرانس [16] سنتز شدند. برای رسم بهتر ترکیبات از نرم افزار MDL ISIS Draw 2.5 استفاده شده است.

جدول ۱: مشتقات دارویی کرومن

شماره ترکیب	ساختار ترکیب	نام آیوپاک	فرمول مولکولی	وزن مولکولی
S1		2-Amino-4-(4-chlorophenyl)-3-cyano-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-5-one	C ₁₉ H ₁₁ N ₂ O ₃ Cl	۳۵۰/۷۶۱ g/mol
S2		2-Amino-4-(4-bromophenyl)-3-cyano-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-5-one	C ₁₉ H ₁₁ N ₂ O ₃ Br	۳۹۵/۲۱۲ g/mol

۲-۲- دستگاه‌ها و تست های مورد استفاده

طبق پروتوکل موجود کیت اندازه گیری، ابتدا در زیر هود ۲۵ میلی گرم از پودر MTT در ۵ میلی لیتر از محیط کشت 1640-RPMI (فاقد فنول رد و موجود در کیت) حل شد و سپس با استفاده از سرنگ و فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتر فیلتر گردید و درون ویال‌های امبر مخصوص محلول MTT ریخته شد و مقدار قابل استفاده برای تست را برداشته و مقادیر باقی مانده موجود در ویال‌های امبر به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

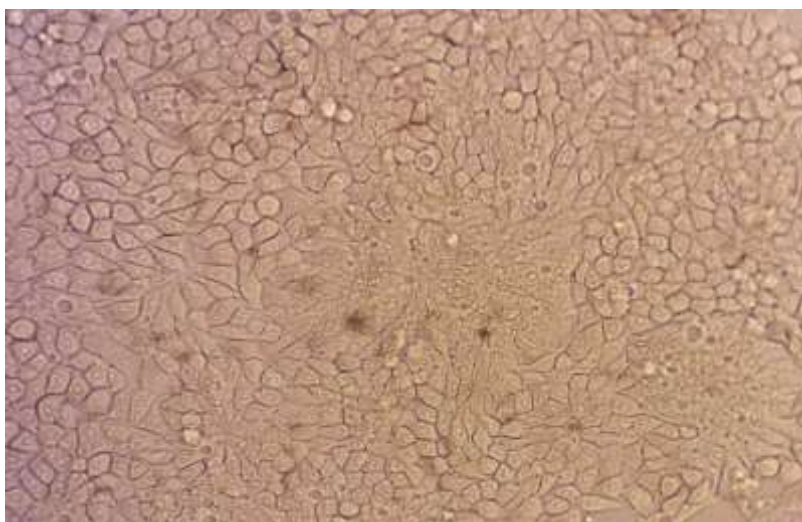
سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ از FBS و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر از آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (Pen/Strep) داخل انکوباتور حاوی CO₂ ۵٪، رطوبت ۱۰۰٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شد تا سلول‌ها به حد نصاب رسیده و آماده پاساژ گردیدند.

زمانی که سلول‌ها کف فلاسک را فرا گرفتند و ظرفیت کف فلاسک تکمیل شد (به صورت تشخیص چشمی زیر میکروسکوپ)، عملیات پاساژ دادن صورت گرفت. بدین مفهوم که مقداری از سلول‌های فلاسک مورد نظر ما برداشته شد و به فلاسک دیگری انتقال یافت. برای اینکار ابتدا فالكون‌های محیط کشت (حاوی FBS و آنتی بیوتیک Pen/Strep و PBS برای گرم شدن در مدت زمان ۵ الی ۱۰ دقیقه به بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد و سپس ویال تریپسین / EDTA ۰/۲۵٪ نیز از فریزر خارج شد و به منظور ذوب شدن با دمای دست، گرم شد.

بعد از این مراحل فلاسک حاوی رده سلولی سرطانی HT-29 از انکوباتور بیرون آورده شد و زیر هود برده شد. سپس محیط رویی سلول‌ها با احتیاط به کمک سمپلر به طور کامل خارج گردیده و کف فلاسک دو بار و هر دفعه با ۳ میلی لیتر PBS

شست‌وشو داده شده و به طور کامل خارج گردید. پس از این مرحله کف فلاسک با ۸۰۰ میکرولیتر از تریپسین/EDTA ۰/۲۵٪ پوشانده شد و به مدت ۲ دقیقه به انکوباتور منتقل شد.

بعد از این مدت زمان از انکوباتور خارج شد و زیر میکروسکوپ برده شد تا از تکی و جدا شدن سلول‌ها اطمینان حاصل شود. سپس فلاسک مجدداً به زیر هود منتقل شد و برای خنثی‌سازی اثر تریپسین به آن ۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم اضافه شد و محتویات فلاسک به یک فالكون ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شد تا به مدت ۵ دقیقه با دور (Rpm) ۲۶۰۰، سانتریفوژ گردد. بعد از آن فالكون به زیر هود انتقال داده شد و محیط رویی دور ریخته شده و رسوب ته فالكون با اضافه کردن مقدار مشخصی محیط کشت پیتاژ گردید و سپس محتویات فالكون توسط لام هموسیستمتر شمارش دقیق شدند و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت سلول ۸۰۰۰ سلول اضافه شد و جهت اتصال مجدد سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت، پس از این مدت محیط رویی سلول‌ها خارج شدند و به سلول‌ها محیط حاوی دارو با دوزهای تعریف شده اضافه گردید و مجدد به انکوباتور منتقل شدند، جهت بررسی اثر دارو زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به سلول‌ها زمان داده شد. پس از این مدت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و محیط قبلی را خارج نموده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک افزوده، سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل شود و سپس در دستگاه میکروپلیت‌خوان و طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب تک‌تک خانه‌های پلیت توسط دستگاه خوانده و ثبت شد. از پلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد و در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول بود اضافه شد. از محیط کشت فاقد سلول، به عنوان بلانک دستگاه میکروپلیت‌خوان و از محیط کشت به همراه سلول و بدون دارو، به عنوان کنترل سلول زنده استفاده شد. لذا سه چاهک شامل سلول و محیط کشت کامل به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. به منظور بررسی فاکتورهای مورد نظر توسط روش فلوسیتومتری، ابتدا سلول‌ها بر طبق غلظت‌های تعیین شده کشت و تیمار شدند و سپس از فلاسک جدا شدند. بعد از انجام این مراحل، رسوب با بایدینگ بافر به خوبی مخلوط و به لوله‌های Unstained، Annexin+PI، PI و Annexin منتقل گردید. لوله‌های مربوطه، ۵ میکرولیتر از رنگ Annexin-V و ۱۰ میکرولیتر از رنگ PI دریافت کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. پس از خوانش توسط دستگاه فلوسیتومتری، داده‌های حاصل از نتایج خوانش دستگاه فلوسیتومتری به کمک نرم‌افزار FlowJo مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه هر آزمایش سه بار به صورت مستقل تکرار شد. برای بررسی اختلاف معنی‌دار گروه‌های مختلف از آزمون ANOVA- دوطرفه استفاده شد و همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 8 رسم شد و نتایج با در نظر گرفتن شاخص انحراف از معیار (SD) گزارش گردید (شکل ۳).

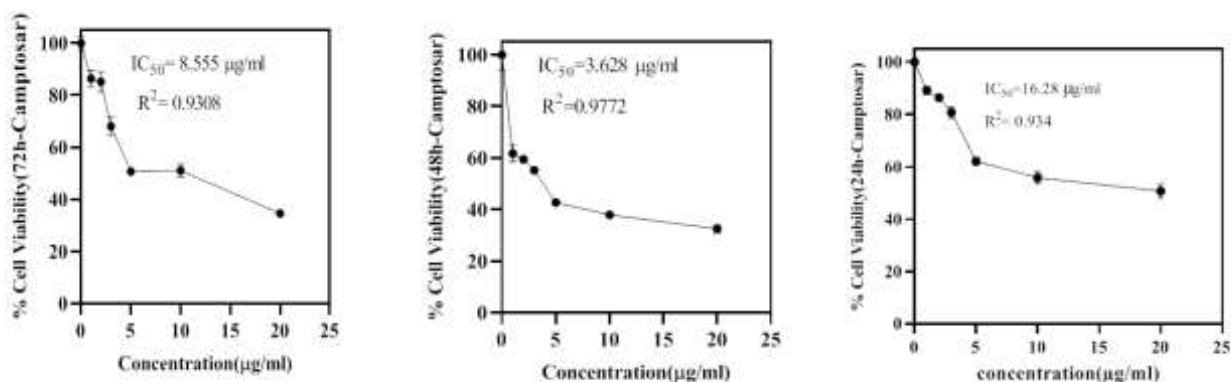


شکل ۳. سلول‌های سرطانی HT-29 در روز هفتم کشت و آماده برای پاساژ (درشت‌نمایی $\times 10$)

۳- بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱- مطالعه سمیت DMSO بر سلول‌های سرطانی

نتایج به‌دست‌آمده در مورد سمیت DMSO در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (شکل ۴) و مقایسه غلظت‌های مختلف DMSO بر سلول‌های سرطانی HT-29 نشان می‌دهد که DMSO در غلظت ۰٫۲ درصد سمیت قابل توجه‌ای بر سلول‌ها ندارد، اما درصدهای بیشتر از یک باعث اعمال کشندگی بر سلول‌ها می‌شود. در ۲ نیز، IC_{50} این داروها برای سلول سرطانی HT-29 در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گردآوری شده است.



شکل ۴. مقایسه IC_{50} مشتقات کرومنی و کمپتوسار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های سرطانی HT-29

۳-۲- مطالعات مورفولوژی و تشخیص بعد از اثر داورهای سنتزی

نتایج آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی HT-29 بعد از ۴۸ ساعت انجام شد. سلول‌های مورد نظر با دوز IC_{50} مربوط به زمان ۴۸ ساعته داروی شیمی‌درمانی کمپتوسار، داروهای S1، S2 تیمار گردید تا به این سوال که آیا اثر سمیت این مشتقات

کرومن در جهت آپوپتوز سلول‌های مورد نظر پیش می‌رود یا موجب نکروز آنها می‌گردد، پاسخ داده شود. از نمونه حاوی محیط کشت و سلول‌های سرطانی HT-29 که تیماری دریافت نکرده اند در حضور حلال به عنوان کنترل و از نمونه حاوی محیط کشت و سلول‌های سرطانی HT-29 که با DMSO تیمار شده بودند، به عنوان کنترل حلال استفاده گردید. میزان کشندگی با اضافه شدن این گروهها مثل کلر یا برم به ساختار نتایج متفاوتی به دست آورد که با انجام آزمایشات تجربی مشاهدات و نتایج دستگاهی با تجزیه و تحلیل بحث شد.

برای تخمین تعداد سلول‌های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با ترکیبات کرومن و مقایسه آن با جمعیت سلولی کنترل، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ AnnexinV-FITC و PI انجام شد. از آنجایی که هنگام وقوع فرآیند آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین‌ها در سطح غشا سلولی قرار می‌گیرند، به AnnexinV متصل شدند و به روش فلوسایتومتری مشخص گردیدند. سلول‌های وارد شده به دستگاه فلوسایتومتری بر اساس اختلاف در میزان نشر رنگ‌های FITC و PI که جذب سلول شده‌اند، مورد دسته‌بندی قرار گرفتند [15] و به کمک نرم افزار FlowJo آنالیز نتایج انجام شد. نقاط ثبت شده در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI، به چهار ناحیه Q1 تا Q4 تقسیم‌بندی گردید. ناحیه Q1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی⁻ Annexin-FITC و PI⁺، ناحیه Q2 نمایانگر سلول‌های تحت آپوپتوز پیر با ویژگی⁺ Annexin-FITC و PI⁺، ناحیه Q3 نمایانگر سلول‌های تحت آپوپتوز جوان با ویژگی⁺ Annexin-FITC و PI⁻ و ناحیه Q4 نشان‌دهنده سلول‌های سالم با ویژگی⁻ Annexin-FITC و PI می‌باشد [18].

با توجه به نوع روش انتخابی موجود در اغلب منابع پیرامون نتیجه‌گیری آنالیزهای مربوط به داده‌های حاصل از تکنیک فلوسایتومتری، مجموع درصد Q2 (سلول‌های پیر که دچار آپوپتوز شده) و Q3 (سلول‌هایی که دچار آپوپتوز جوان شده‌اند) به عنوان درصد کل برای آپوپتوز و درصد سلول‌های قرار گرفته در ناحیه Q1 و Q4 به ترتیب، به عنوان سلول‌های نکروزی و سالم در نظر گرفته شد. درصد نهایی آپوپتوز، با کسر (Q2 و Q3) از میزان آپوپتوز نمونه کنترل گزارش شد (جدول ۲).

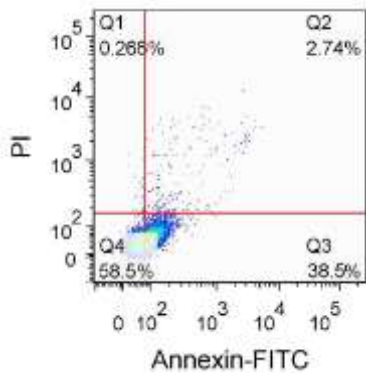
جدول ۲. بررسی و مقایسه میزان درصد آپوپتوز و نکروز سلول‌های سرطانی HT-29 تیمار شده در طی ۴۸ ساعت

نوع کشندگی تیمار	آپوپتوز	نکروز
کنترل حلال (DMSO)	32.96%	0.04%
کمپتوسار	58.76%	0.01%
کرومن - کلر	67.08%	0.00%
کرومن - برم	65.98%	0.00%

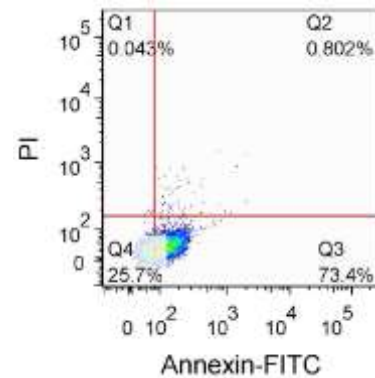
نتایج حاصل از داده‌های فلوسایتومتری نشان داد که میزان آپوپتوز سلول‌های HT-29 تیمار شده در طی ۴۸ ساعت برای کرومن-کلر، کرومن-برم به ترتیب؛ ۶۷/۰۸٪ و ۶۵/۹۸٪ بود، در صورتی که میزان آپوپتوز برای داروی شیمی‌درمانی کمپتوسار ۵۸/۷۶٪ در همین زمان بود. با این تفاسیر در شرایط یکسان آپوپتوز ناشی از این ترکیبات تا حدودی بیشتر از آپوپتوز ایجاد

شده توسط کمپتوسار بر روی سلول‌های HT-29 نشان داده شد. همچنین میتوان گفت میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط کرومن-کلر از کرومن-برم نیز تا حدودی بیشتر بود.

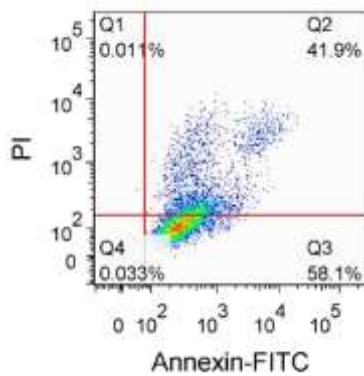
آنالیز نهایی داده‌های حاصل از تکنیک فلوسایتومتری برای نمونه‌های کنترل حلال (الف)، کنترل (ب) و همچنین نمونه‌های تیمار شده با ترکیب کرومن-کلر (ج)، داروی شیمی‌درمانی کمپتوسار (د) و ترکیب کرومن-برم (ی) برای ۴۸ ساعت در تصویر زیر (شکل ۵) قابل مشاهده هستند.



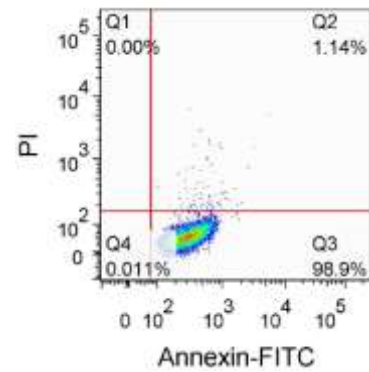
(ب)



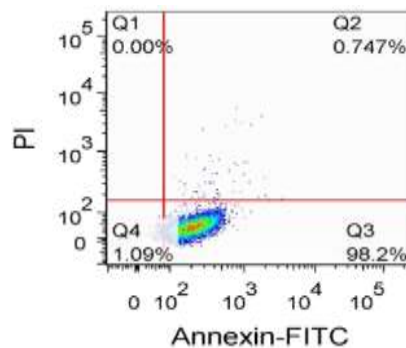
(الف)



(د)



(ج)



(ی)

شکل ۵. آنالیز نهایی داده‌های حاصل از تکنیک فلوسایتومتری مربوط به سلول‌های سرطانی HT-29 برای ۴۸ ساعت برای نمونه‌های حلال (الف)، کنترل (ب)، تیمار شده با ترکیب کرومن-کلر (S1) (ج)، داروی شیمی‌درمانی کمپتوسار (د) و تیمار شده با ترکیب کرومن-برم (S2) (ی)

۴- نتیجه گیری

علم سلولی و مولکولی بسیار وسیع است که می تواند از جنبه های مختلف مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد و در این کار سعی شده بود که از علوم بین رشته ای و ارتباط دادن آن ها به همدیگر بویژه در مطالعات زیستی که بیشتر مبتنی بر تجارب آزمایشگاهی است استفاده شود و نو آوری این کار ارتباط موثر این موضوع بوده است. به طوری که در نوع برم کرومن سنتزی، با روشهای شبیه سازی مشخص شد که پایداری مولکول نسبت به برم بیشتر است اما با توجه به مطالعات و بررسی های انجام شده و سمی بودن بسیار زیاد برم برای سلولها، مطالعه در جهت کلر به عنوان مولکولی کاربردی تر در بحث دارویی دنبال شد که خوشبختانه نتایج خوبی بدست آمد. امروزه کشف ترکیبات نوین با اثرات دارویی موثرتر در زمینه شیمی آلی، بیوشیمی و شیمی دارویی مورد توجه قرار گرفته است که از میان آنها، ترکیبات هتروسیکلیکی را میتوان نام برد. مشتقات کرومن از جمله این ترکیبات دارویی هتروسیکلیکی هستند. تاکنون طیف گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی آنها مانند خواص ضد توموری، آنتی اکسیدان بودن، ضد التهاب بودن، ضد ویروسی، ضد قارچ بودن، ضد میکروبی، تنظیم فشار خون، ضد HIV، ضد سل و سایر موارد به اثبات رسیده است. در این میان گزارش های پیرامون خواص ضد توموری و ضدسرطانی آنها حائز اهمیت می باشد. از جمله نقص های رایج در سلول های سرطانی میتوان اختلال در فرایند آپوپتوز را نام برد. القای آپوپتوز میتواند به عنوان یکی از استراتژی های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید. با توجه به این موضوع اثر آپوپتوزی ترکیبات کرومنی بر سلول های سرطانی حائز اهمیت می باشد [19]. بررسی القاء تمایز و مرگ سلولی مشتقی از خانواده ی ۴-آریل-۴H-کرومن ها بر روی سلول های NB4 مربوط به لوسمی پرومیلوسیت حاد انسانی نشان داد که؛ این ترکیب سبب مهار رشد وابسته به زمان و غلظت می گردد. بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلول ها با غلظت های پایین (۳ نانو مولار) از ترکیب مورد نظر، سلول های NB4 به سمت ماکروفاژ/ مونوسیت تمایز یافتند. نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول ها با هوخست ۳۳۲۵۸ نیز نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول ها با غلظت IC₅₀ از ترکیب، آپوپتوز در سلول ها القاء شد [20]. سری جدیدی از ترکیب کرومنی S2 به عنوان القاء کننده های آپوپتوزی شناسایی شده اند. ۶ سری از این ترکیب که شامل MX-58276، MX58151، MX-76747، MX-116214، MX116407 و MX-126303 می باشند، اثرات سایتوتوکسیسیته قوی در شرایط Invitro از خود نشان دادند. به علت تداخل این ترکیبات با توبولین در جایگاه اتصال به کلشی سین، پلیمریزاسیون توبولین مهار می گردد، که در نتیجه منجر به توقف چرخه سلولی می شود و در نهایت باعث ایجاد آپوپتوز می گردد. علاوه بر موارد یاد شده این ترکیبات موجب تداخل ناچیزی در تشکیل عروق خونی و در شرایط آزمایشگاهی در غلظت های پایین می شود [21]. نتایج بررسی اثرات سایتوتوکسیک و القاء آپوپتوزی بعضی از مشتقات جدید ترکیبات کرومن، ۴-آریل-۴H-کرومن بر رشد رده های سلولی تومور انسانی شامل؛ MCF-7 (سرطان پستان)، A549 (سرطان ریه)، HEPG-2 (سرطان کبد)، SW-480 (سرطان کولون)،

1321N1 (آستروسیتوما)، U87-MG (گلیوبلاستوما) و DAOY (مدولوبلاستوما) در حالت *In vitro* با به کارگیری روش MTT و روش رنگ آمیزی DNA سلول (DAPI staining) نشان داد که، مشتقات سنتز شده‌ای که دارای گروه شیمیایی فنیل-ایزواکسال یا حاوی گروه متوکسی در زنجیره شیمیایی خود می‌باشند، اثر سیتوتوکسیسیته سلولی و اثر القاء آپوپتوزی بیشتری در مقایسه با داروی شیمی درمانی از خود نشان می‌دهند. در واقع جابه‌جایی گروه شیمیایی تریمتوکسیفنیل با گروه شیمیایی تiazol در مشتقات کرومن سنتز شده، باعث کاهش اثر سیتوتوکسیسیته ترکیب کرومن می‌گردد. این در حالیست که مشتق سنتز شده‌ای که حاوی گروه شیمیایی فنیل-ایزواکسال باشد، اثرات سیتوتوکسیسیته و القاء آپوپتوزی مشابهی دارد. از میان این ترکیبات، دو مورد که شامل ترکیبات کرومن به ترتیب دارای استخلاف کلر و برم بودند با $IC_{50} = 4/2 \pm 1/1$ و $IC_{50} = 6/1 \pm 0/26$ و داروی شیمی‌درمانی دارای $IC_{50} = 5/2 \pm 0/7$ ، آزمایش شدند. در نتایج بدست آمده، ترکیبی که دارای استخلاف برم بود در مقایسه با ترکیب استخلاف کلر، سیتوتوکسیسیته بالاتری را نشان داد. بسیاری از داروهای ضدسرطانی موجب القاء مرگ سلول که اغلب از نوع آپوپتوز می‌باشد، می‌شوند. این داروها اثر آپوپتوزی خود را با ایجاد توقف در چرخه سلولی در مرحله G_1 یا S یا G_2/M اعمال می‌کنند. از جمله نقاطی که سلول برای ترمیم DNA خود اتخاذ می‌کند، نقاط کنترل چرخه سلولی می‌باشد. مرگ سلولی موجب حذف سلول‌هایی می‌شود که دچار صدمات جبران‌ناپذیری شده‌اند. براساس مطالعاتی که انجام شده کرومن‌ها چرخه سلولی را در فاز G_2/M متوقف می‌کنند. تجمع در فاز G_2/M به‌طور کلی به دلیل اثرگذاری عوامل تخریب‌کننده DNA همانند؛ تشعشعات پرنرژی و مضر گاما، ترکیبات پایدارکننده میکروتوبول و مهارکننده توپوایزومرازها می‌باشد [۲۲].

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلوسایتومتری به دست آمده حاکی از آن است که دو ترکیب مورد نظر، اثر سیتوتوکسیسیته خود بر سلول سرطانی HT-29 را از طریق القاء آپوپتوز بر این سلول‌ها اعمال کرده‌اند؛ چرا که میزان نکروز ۰/۰۰٪ بود. در تمامی تست‌های انجام شده ترکیب کرومن-کلر با استخلاف کلر، موثرتر ظاهر شده بود. پیش‌بینی می‌گردد که این ترکیب حجم و ممانعت فضایی کمتری نسبت به ترکیب دیگر داشته و همچنین به دلیل هیدروفیل بودن کلر با فرار گرفتن در معرض سلول آب بیشتری را از سلول گرفته و باعث کشندگی بیشتری شده است. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش که این ترکیبات می‌توانند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی HT-29 القاء کنند، می‌توانند به عنوان کاندیدای مناسبی برای کنترل سرطان کولون مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرند. جایگزینی حلال‌هایی با سمیت کمتر به جای حلال DMSO برای ترکیبات کرومنی توصیه می‌گردد.

۵- تقدیر و تشکر

از دانشگاه علوم پزشکی سبزواری جهت مشارکت در تهیه سلول‌های HT-29 و گروه شیمی آلی دانشگاه مازندران به دلیل در اختیار قرار دادن مشتقات کرومن سنتزی در آزمایشگاه‌های این دانشگاه، سپاسگزاری می‌شود.

۶- منابع و ماخذ

- [1] Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- [2] Engin, O. (2015). *Colon polyps and the prevention of colorectal cancer*. Springer.
- [3] Estrada, R. G. M. D., & Spjut, H. J. M. D. (1980). Hyperplastic polyps of the large bowel. *The American journal of surgical pathology*, 4(2), 127-133.
- [4] Ullah, M. F. (2008). Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9(1), 1-6.
- [5] Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203), 1445-1449.
- [6] Dlamini, Z., Mbita, M., & Zungu, M. (2004). Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*. 101(1), 1-15.
- [7] Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., & Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283(1), 1-16.
- [^] Abrams, J. M., & White, M. A. (2004). Coordination of cell death and the cell cycle: linking proliferation to death through private and communal couplers. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 634-638.
- [9] Ellis, G. (2009). *Chromenes, Chromanones, and Chromones*. John Wiley & Sons.
- [10] Okasha, R. M., Alblewi, F. F., H. Afifi, T. H., Fouda, A. M., Al-Dies, A. M., & El-Agrody, A. M. (2017). Design of new benzo[h]chromene derivatives: antitumor activities and structure-activity relationships of the 2,3-positions and fused rings at the 2,3-positions. *Molecules*, 22(3), 479-496.
- [^ 1] Lee, J. Y., Ahn, S. S., Jeong, Y. J., Choi, J., Ahn, S., Koh, D., Lee, Y. H., Lim, Y., & Shin, S. Y. (2020). A synthetic pan-aurora kinase inhibitor, 5-methoxy-2-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-4H-chromen-4-one, triggers reactive oxygen species-mediated apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Journal of Chemistry*, Article ID 3025281.
- [12] Ahagh, M. H., Dehghan, G., Mehdipour, M., Teimuri-Mofrad, R., Payami, E., Sheibani, N., Ghaffari, M., & Asadi, M. (2019). Synthesis, characterization, anti-proliferative properties and DNA binding of benzochromene derivatives: Increased Bax/Bcl-2 ratio and caspase-dependent apoptosis in colorectal cancer cell line. *Bioorganic Chemistry*, 93, 103329.
- [^ 3] Ahmed, H. E. A., El-Nassag, M. A. A., Hassan, A. H., Okasha, R. M., Ihmaid, S., Fouda, A. H., Afifi, T. H., Aljuhani, A., & El-Agrody, A. M. (2018). Introducing novel potent anticancer agents of 1H-benzo[f]chromene scaffolds, targeting c-Src kinase enzyme with MDA-MB-231 cell line anti-invasion effect. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 33(1), 1074-1088.
- [14] Hekmati, M., Yousefi, M., Ziyadi, H., Ghasemi, E., Safari Mehr, P., Veisi, H., & Maleki, B. (2021). Catalytic applications of coated nanopalladium particles coated on modified GO by Thymbraspicata extract in Suzuki coupling reactions. *Applied Chemistry*, 16(58), 233-244. (in persion)

- [15] Maleki, B., Ayazi Jannat Abadi, S., Baghayeri, M., Rahnamaye Aliabad, H. A., & Veisi, H. (2018). One-pot and three-component of tetrahydrobenzo [b] pyran derivatives using heterogeneous and recyclable catalysts and its application toward silver nanoparticle synthesis. *Applied Chemistry*, 13(48), 209-230. (in persion)
- [16] Sargazi Karbasaki, S., Bagherzade, G., Maleki, B., & Ghani, M. (2021). Fabrication of sulfamic acid functionalized magnetic nanoparticles with dendrimeric linkers and its application for microextraction purposes, one-pot preparation of pyrans pigments and removal of malachite green. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 118, 342-354.
- [17] LaPensee, E. W., Schwemberger, S. J., LaPensee, C. R., Bahassi, E. M., Afton, S. E., & Ben-Jonathan, N. (2009). Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione- S –transferase. *Carcinogenesis*, 30(8), 1298-1304.
- [18] Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. L. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, 182 (5): 1545–1556.
- [19] Thomas, N., & Zachariah, S. M. (2013). Pharmacological activities of chromene derivatives: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2), 11-15.
- [20] Naseri, M. H., Hessami, T. S., Mahdavi, M., Moosavi, M., Abasalti, S., & Foroumadi, A. (2013). Induction of differentiation and cell death of the derivative of 4-aryl-4H-Chromenes Family on NB4 human promyelocytic Leukemia cell line. *Journal of Cell and Tissue*. 2(4), 139-147.
- [21] Gourdeau, H., Leblond, L., Hamelin, B., Desputeau, C., Dong, K., Kianicka, I., Custeau, D., Boudreau, C., Geerts, L., Cai, S. X., Drewe, J., Labrecque, D., Kasibhatla, S., & Tseng, B. (2004). Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (11): 1375–1384.
- [22] Khan, M., Rasul, A., Yi, F., Zhong, L., & Ma, T. (2011). Jaceosidin induces p53-dependent G2/M phase arrest in U87 glioblastoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(12), 3235-3238.

