

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 متabolیزه شدن ماده تترازولیوم در سلول های زنده بلورهای بنش نگ فورمازان تشکیل شدند، محتویات هر خانه با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین و به دنبال آن محلول های بنش نگی 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:

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 سوبسترانی سلولی خاص یا جذب و سپس استخراج یک رنگ معروف شده اند. 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

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

مربوط به هر غلظت با به کار گیری فرمول زیر محاسبه شد:

با توجه به مقادیر جذب نوری به دست آمده به وسیله دستگاه الایزا ریدر درصد مهار رشد

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

سلولی) کشت داده، و سپس انکوبه کرده بعد از ۲۴ ساعت چالکونی که بیشترین اثر مهاری را بر روی سلول های سلطانی 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

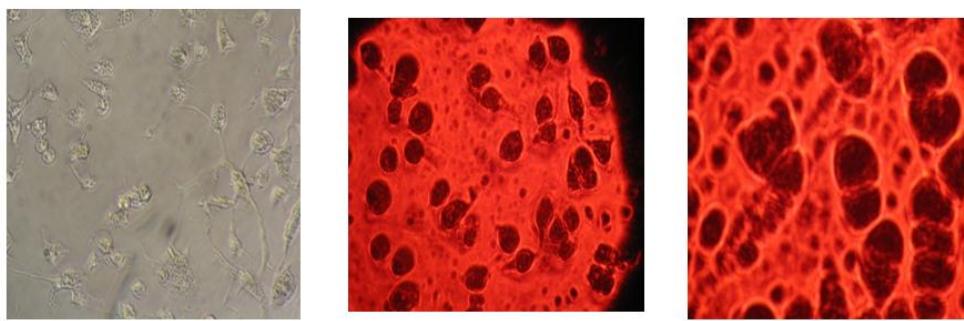
در نهایت داده ها پس از جمع آوری با استفاده از روش Students T-Test تجزیه و تحلیل شد. اختلاف در سطح احتمال معنی دار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

تعیین نوع مرگ سلولی از طریق رنگ آمیزی آکریدین اورنج/پروپریدیوم آبیود: ابتدا سوسپانسیون سلولی را تهیه کرده و در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای (در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

نتایج مربوط به بررسی تغییرات ایجاد شده در سلول های سرطانی *HeLa* در طی آپوپتوز؛ سلول های سرطانی HeLa ابتدا کشت و پاساز داده و سوسپانسیونی از این سلول ها با غلظت مشخص در محیط کشت تهیه شد. در غلظتی که بیشترین IC₅₀ 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.

جذب نوری خوانده شده در غلظت های مختلف دارای اختلاف معنی دار($P \leq 0.05$) 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 استفاده از آزمون (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl prop -2-en-1-one بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول ها به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است(جدول شماره ۱).



A B C

شکل شماره ۱. مورفولوژی سلول های *HeLa* (A) سلول های تیمار نشده (B) سلول های تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون (C) سلول های تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون بعد از ۲۴ ساعت (C) سلول های تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون بعد از ۷۲ ساعت. مطالعات مورفولوژیک نشان داد که بعد از ۷۲ 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.

بحث و نتیجه گیری

چالکون ها پیش سازهای کلیدی در سنتز بسیاری از هتروسایکل های بیولوژیکی مهم مانند pyrazolines 1-4-diketones benzothiazepine 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 آپوپتوزی 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 کشنندگی چالکون-(E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl)benzofuran-5-yl)-3-phenyl propone 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 بروی سلول های سالم (لغوسيت و منوسيت خون) اثر داده شده 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 isobavachalcone, licochalcon A, chalcone, butein, xanthohumol تست شده: 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 شیمیابی سرطان پروستات مورد تایید قرار دادند(۲۲). مطالعات انجام شده نشان داد که ترکیبات 3,3-Diphenylpropenone 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-

سنجه 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

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 Res*2008;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. *BioTechniques*2009; 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 Cancer*2010; 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 Nutr*2003;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 RES*2009;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 Chem*2007;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. Chalcones: a new class of antimitotic agents. *J Med Chem*1990; 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 Chem*2012;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 Methods*1983; 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

