

سنتز ترکیبات بر پایه پیرانو[۲،۳-سی] پیرازول جهت القای آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی لنفوم سلول B2 در رده سلول سرطان سینه انسان MCF-7

حمیده شهریارى نژاد^۱، نگین پورمحسن^۱، حسین غفوری^{۲*}، سودا زارعی^۱، رقیه شریفی^۱، نصرت ا. محمودی^۲^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ^۲گروه شیمی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین لنفوم سلول B2 یک هدف بالقوه برای درمان تومور است. مهار بیان لنفوم سلول B2 هدف اصلی در زمینه تولید داروهای ضدسرطان می باشد. اخیراً، ارزیابی اثرات ضدتوموری مشتقات پیرازولی امیدوار کننده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مهارى مشتقات پیرازولی جدید بر روی بیان Bcl2 در رده سلول سرطان سینه انسانی MCF-7 انجام شده است.

مواد و روش: در این مطالعه تجربی در شرایط آزمایشگاهی، مواد تازه سنتز شده بر علیه آدنوکارسینومای سینه غربال شدند. آنالیز وسترن بلات برای مطالعه مسیرهای سیگنالینگ سلول های سرطان سینه MCF-7 انجام شد. سطح پروتئین ضد آپوپتوزی لنفوم سلول B2 با آنالیز وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات در بیان آن تایید شد. داده های به دست آمده با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس یکطرفه و تی مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: ترکیبات HN1 و HN2 به طور معنی داری تکثیر سلول های سرطان سینه انسانی را مهار می کنند ($p < 0.05$). ترکیبات HN1 و HN2 رشد سلول های MCF-7 را به ترتیب با مقادیر غلظت بازدارندگی $7/4$ و $8/68$ میکروگرم بر میلی لیتر مهار می کنند. علاوه بر این، ترکیبات HN1 و HN2 ($50 - 22/5$ میکروگرم بر میلی لیتر) به طور معنی داری باعث کاهش تولید پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 می شوند ($p < 0.05$). ترکیب HN2 به طور معنی داری بیان Bcl-2 را به صورت وابسته به غلظت مهار می کند، به این صورت که در غلظت $24/5$ درصد و در غلظت 50 میکروگرم بر میلی لیتر با 30 درصد کاهش بیان Bcl-2 را موجب می شود. همچنین ترکیب HN1 در غلظت های مشابه به ترتیب در غلظت های $37/5$ و 50 میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار صفر و 12 درصدی بیان Bcl-2 در سلول های MCF-7 می شود.

نتیجه گیری: HN2 می تواند رشد و تکثیر سلول های MCF-7 را سرکوب و آپوپتوز را با کاهش فاکتور آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در سلول های سرطانی القا کند. این نتایج نشان داد که اثر مهارى HN2 بر علیه رشد سلول های سرطان سینه انسانی MCF-7 ممکنه با القای آپوپتوز از طریق مسیر وابسته به پروتئین Bcl2 همراه باشد. نتایج حاضر نشان می دهد که HN2 دارای پتانسیل امیدوارکننده ای است که به عنوان یک عامل بازدارنده شیمیایی با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پیرازول، آپوپتوز، سلول های MCF-7، Bcl-2

*نویسنده مسئول: حسین غفوری، رشت، دانشگاه گیلان، گروه زیست شناسی

Email: H.ghafoori@guilan.ac.ir

مقدمه

سرطان بیماری است که در آن سلول های بدن در یک تومور بدخیم به طور غیرعادی تکثیر می شوند و بافت های سالم را تخریب می کنند که در نتیجه آنها یک سلول می تواند در برابر محدودیت های معمول در رشد و تکثیر سلول ها مقاومت کند (۱). تومور های خوشخیم یا غیرسرطانی، به سایر قسمت های بدن گسترش نمی یابند و تومور های جدید ایجاد نمی کنند. تومور های بدخیم یا سرطانی سلول های سالم را از بین می برند، در عملکرد های بدن دخالت دارند و مواد مغذی را از بافت های بدن دریافت می کنند (۲).

سرطان ها همچنین از طریق فرآیندی به نام متاستاز گسترش می یابند، در سال های اخیر بیشترین میزان مرگ و میر به ترتیب ناشی از سرطان؛ ریه، سینه، پروستات و روده بزرگ می باشد (۳). در سال ۲۰۱۲، حدود ۱۴/۱ میلیون مورد جدید سرطان و ۸/۲ میلیون مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان رخ داده است، سرطان پس از بیماری ها و حوادث قلبی - عروقی، سومین علت مرگ و میر در ایران است (۴). در بین سرطان ها، سرطان سینه بیشترین مرگ و میر را در میان زنان در کشورهای در حال توسعه به خود اختصاص داده است (۵).

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده نقش مهمی در کنترل تنظیمات فیزیولوژیکی سلول ایفا می کند. این یک فرآیند بیولوژیکی است که به واسطه نسبت پروتئین های آنتی آپوپتوزی و پرو آپوپتوزی هدایت شده است (۶). پژوهشگران متعددی تلاش

می کنند که القا آپوپتوز را از طریق فاکتور های کلیدی همانند گیرنده لیگاند القا کننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز کننده تومور (TNF) (۱)، پروتئین های خانواده Bcl-2، کاسپازها و پروتئین های مهار کننده آپوپتوز مورد هدف قرار دهند (۶).

آپوپتوز در بسیاری از تومور های انسانی مختل شده است، این نشان می دهد که اختلال در عملکرد آن به طور قابل توجهی باعث تغییر سلول طبیعی به یک سلول توموری می شود. تعدادی از محرک ها یا سیگنال های سلولی که می تواند آپوپتوز را در سلول القا کند، وجود دارد که به دو گروه سیگنال های بیرونی و سیگنال های درونی تقسیم می شوند (۷). سیگنال های بیرونی شامل لیگاند القا کننده مرگ که به گیرنده های سطح سلول به نام گیرنده های مرگ متصل می شوند و این لیگاندها، عوامل فاکتور های محلول و یا مولکول های سطح سلول لنفوسیت های تی می باشند. سیگنال های درونی بر روی نفوذ پذیری غشای خارجی میتوکندری متمرکز شده است. (۷). همه مسیر های آپوپتوزی در مرحله اجرا همگرا هستند. این مسیرها با فعال شدن کاسپازها که فرآیند آپوپتوز را شروع می کنند، استارت می خورد. کاسپاز ۳، کاسپاز ۶، کاسپاز ۷ به عنوان کاسپاز های اجرایی عمل می کنند و اندونوکلاز سیتوپلاسمی را فعال می کنند (۹ و ۸)، یک جزء مهم از مسیر آپوپتوزی پروتئین های خانواده شناخته شده Bcl-2 که شامل حدودا ۲۵ عضو از جمله پروتئین

1-Tumor Necrosis Factor(TNF)

آنتی-آپوپتوتیک Bcl-2 می‌باشد. از آن جایی که پروتئین‌های خانواده Bcl-2 تنظیم کننده کلیدی آپوپتوز است، اختلال در عملکرد آن در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، دخیل هستند. پروتئین Bcl-2 و پروتئین‌های سیتوپلاسمی مرتبط با آن، تنظیم کننده-های کلیدی آپوپتوز، هوموستاز بافت و حفاظت در برابر بیماری‌ها هستند. پروتئین آنتی-آپوپتوتیک Bcl-2 یک پروتئین غشایی ضروری است که عمدتاً بر روی غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. بیان بیش از حد آن مانع آپوپتوز سلول‌ها در پاسخ به تحریک‌های مختلف می‌شود. سیتوکروم c برای شروع آپوپتوز ضروری می‌باشد که نشان دهنده ارتباط احتمالی بین پروتئین Bcl-2 و سیتوکروم c است. بیان بیش از حد Bcl-2 مانع خروج سیتوکروم c از میتوکندری می‌شود و آپوپتوز را مهار می‌کند. بنابراین یکی از نقش‌های احتمالی Bcl-2 در جلوگیری از آپوپتوز با انسداد رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری است (۱۰). اعضای خانواده Bcl-2 برای نگهداری سیستم‌های اصلی اندام ضروری هستند و جهش‌هایی که بر آنها تأثیر می‌گذارد، در سرطان دخیل می‌شوند (۱۱). هدف قرار دادن انتخابی پروتئین‌های خانواده Bcl-2، می‌تواند پتانسیل قابل توجهی برای استراتژی‌های درمانی علیه بیماری‌های ناشی از تکثیر بیش از حد سلول یا مرگ سلول داشته باشد. به نظر می‌رسد که بتوان با ترکیباتی که مسیرهای مولکولی خاصی از قبیل مسیر فعال شدن آنزیم‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز را، مورد هدف قرار می‌دهند، درمان

بدون عوارض جانبی را ایجاد کرد (۱۱). در همین راستا در این تحقیق اثر ترکیبات سنتزی جدید که برپایه گروه پیرانوپیرازول با نام آیوپاک ۴، ۴-، ۱- فنیلین) بیس (۵- آمینو-۳- متیل -۱، ۴- دی- هیدروپیرانو-۲، ۳- c] پیرازول - ۶- کربونیتیل) و ۶- آمینو-۴- (۲- متوکسی فنیل)-۳- متیل -۱، ۴- دی- هیدروپیرانو-۲، ۳- c] پیرازول - ۵- کربونیتیل، بر روی رده سلول سرطان سینه انسان MCF-7، به منظور بررسی قدرت القای آپوپتوز در این رده سلولی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی سیتوتوکسیک ترکیب سنتزی با روش MTT^(۱۲) مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین هدف از این مطالعه سنتز و بررسی اثر مشتقات بر پایه پیرانو [۲، ۳- c] پیرازول جهت القای آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی لنفوم سلول B2 در رده سلول سرطان سینه MCF-7

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه گیلان انجام شد، اثر ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 بر روی القا آپوپتوز در سلولهای سرطان سینه MCF-7 در شرایط in vitro مورد مطالعه قرار گرفت. از روش وسترن بلات جهت بررسی بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 در سلولهای MCF-7 تحت تیمار با ترکیبات سنتزی استفاده شد.

محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک pen-strep همگی از شرکت Bioidea

محلول ۵ درصد NaOH به عنوان کاتالیزور، در حلال اتانول و در شرایط رفلاکس سنتز شد. جهت کامل شدن واکنش بالن درون حمام آب سرد قرار گرفته و آب مقطر سرد به درون آن اضافه شد. سپس رسوب به دست آمده به وسیله کاغذ صافی، صاف و در آون خشک شد. جهت خالص سازی بیشتر به وسیله اتانول مورد تبلور مجدد قرار گرفت. ساختار ترکیب به دست آمده با روش های اسپکتروسکوپی UV-visible، FT-IR و NMR مورد تأیید قرار گرفت.

سلول های سرطانی رده سلولی MCF-7 مربوط به سرطان سینه و از نوع چسبنده، در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک pen-strep کشت داده شدند و در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند. جهت پاساژ سلولی بعد از پر شدن ۸۰ تا ۹۰ درصد از کف فلاسک، سلول ها به کمک محلول تریپسین EDTA از کف فلاسک برداشت شده و به میکروتیوب منتقل شدند. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شد. به رسوب محیط کشت DMEM حاوی FBS اضافه گشته و در فلاسک T25 کشت داده شد. سلول ها تا رسیدن به فاز رشدی مناسب پاساژ داده شدند.

پس از رسیدن سلول های MCF-7 به فاز رشد مناسب، سلول ها به وسیله لام نئوبار شمارش شده و به تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه با

خریداری شدند، مواد شیمیایی مورد استفاده در سنتز ترکیبات از Merck و Sigma خریداری شدند.

جهت سنتز ترکیبات مورد نظر که از مشتقات پیرانو پیرازول ها می باشند، ابتدا ترکیب پایه پیرازولون، تحت یک واکنش تراکمی بین اتیل استواسات و هیدرازین سنتز شد. استیک اسید به عنوان کاتالیزور این واکنش می باشد.

سنتز ۴،۴- (۴،۱- فنیلن) بیس (۵-آمینو-۳- متیل ۴،۱- دی هیدرو پیرانو [۳،۲-c] پیرازول -۶- کربونیتریل (HN1): این ترکیب از واکنش ۱ میلی مول پیرازولون، ۱/۱ میلی مول مالونیتریل و ۱ میلی مول ترفتالدهید در حضور محلول ۵ درصد سود (NaOH) به عنوان کاتالیزور در حلال اتانول و در شرایط رفلاکس سنتز شد. جهت کامل شدن واکنش بالن را در حمام آب سرد قرار داده و آب مقطر سرد به داخل آن اضافه شد، سپس رسوب به دست آمده به وسیله کاغذ صافی، صاف و سپس در آون خشک گردید. ساختار ترکیب شیمیایی جهت خالص سازی بیشتر در حلال اتانول تبلور مجدد یافت. ساختار ترکیب سنتز شده با روش های اسپکتروسکوپی UV-visible، FT-IR و NMR تأیید شد.

سنتز ۶- آمینو-۴- (۲- متوکسی فنیل) -۳-، ۴- دی هیدرو پیرانو [۳،۲-c] پیرازول -۵- کربونیتریل (HN2): این ترکیب نیز مانند ترکیب قبل از واکنش ۱ میلی مول پیرازولون، ۱/۱ میلی مول مالونیتریل و ۱ میلی مول از آریل آلدئید دارای استخلاف متوکسی، ۲- متوکسی بنز آلدئید در حضور

محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت اتصال به پلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت قبلی خارج و با محیط کشت جدید حاوی ۱ درصد FBS به همراه دورزهای مختلف ترکیبات سنتزی NH₁ و NH₂ (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) جایگزین شد.

جهت بررسی سمیت سلولی ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 در مدت زمان ۲۴ ساعت، از تست MTT استفاده شد. این تست، یک روش رنگ‌سنجی کمی است که بر اساس احیای نمک زرد رنگ MTT، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز به کریستال‌های آبی رنگ و نامحلول در آب فورمازان انجام می‌گیرد. این واکنش تنها در سلول‌های زنده انجام می‌شود، بنابراین جذب نوری بلورهای فورمازان پس از حل شدن در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، با تعداد سلول‌های زنده مرتبط است. برای این منظور، پس از تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با ترکیبات سنتزی، محیط کشت قبلی خارج و با محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد محلول MTT جایگزین شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام این زمان، محیط کشت رویی سلول‌ها به آرامی خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد. پس از انحلال فورمازان، جذب به وسیله دستگاه الیزا ریدر (Biotek, USA) در طول

موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که هر غلظت در سه چاهک تکرار شد (۱۲).

درصد بقا به وسیله فرمول زیر به دست آمد:

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب گروه تیمار شده}}{\text{میانگین جذب گروه کنترل}} = \text{درصد بقا}$$

IC₅₀ که بیان‌گر غلظتی از ترکیب است که باعث مهار رشد ۵۰ درصد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌شود، پس از رسم منحنی، با به کارگیری غلظت‌های مختلف تیمار و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد.

برای لیز کردن سلول‌ها از Lysis Buffer (۵۰۰ میکرولیتر تریس-HCl با pH=۸، ۲ میلی‌گرم EDTA، ۸۰ میلی‌گرم NaCl، ۲۵ میلی‌گرم سدیم دئوکسی کولات، ۱۰ میلی‌گرم SDS، ۱۰ میکرولیتر Triton ۱ درصد (NP40)) و مخلوطی از مهارکننده پروتئازها استفاده شد و سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاوی پروتئین استخراج شده، جداسازی شده و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای بررسی کمی غلظت پروتئین جهت بارگذاری مقدار مساوی از نمونه‌های پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE ابتدا غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش بردفورد تعیین شد. در این روش ابتدا غلظت‌های متنوعی از پروتئین استاندارد BSA تهیه و پس از افزودن محلول بردفورد به آن جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده از جذب پروتئین

استاندارد، غلظت پروتئین هر یک از نمونه ها تعیین شد.

به منظور تشخیص و آنالیز بیان پروتئین Bcl-2 در نمونه سلولی، با استفاده از آنتی بادی، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. به این صورت که مقدار مشخصی از هر نمونه بر روی چاهک های ژل الکتروفورز بارگذاری و الکتروفورز با اعمال جریان الکتریکی انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز ژل به آرامی از شیشه ها جدا شده و در بافر انتقال (۲/۴۲ گرم تریس، ۱۱/۲۵ گرم گلیسین، ۲۰۰ میلی لیتر متانول و حداکثر ۱۰۰ میلی لیتر آب) جهت انجام ایمونوبلاکینگ قرار گرفت. سپس صفحه PVDF نیز در بافر انتقال قرار گرفت، انتقال پروتئین از ژل به PVDF صورت پذیرفت. این سیستم دارای محفظه حاوی بافر انتقال است که شامل؛ اسفنج، ظرف یخ و کاست مخصوص نیز می باشد. PVDF، اسفنج و ژل در درون این کاست قرار می گیرد. ترتیب قرارگیری در کاست به ترتیب شامل؛ اسفنج، کاغذ صافی، ژل و PVDF، کاغذ صافی و اسفنج است و اصطلاحاً ساندویچ گفته می شود. در نهایت دستگاه با ولتاژ ۱۰۰ میلی ولت به مدت یک ساعت به منبع مولد جریان، متصل گشته و پروتئین های موجود در ژل به PVDF منتقل شد. پس از اتمام انتقال پروتئین ها بر سطح PVDF، صفحه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ (بافر TBST، ۲ درصد شیرخشک بدون چربی) به شکل ملایمی تکان داده شد.

محلول بلاکینگ به منظور پوشاندن صفحه برای جلوگیری از واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی

اولیه به کار می رود. پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ، صفحه با آنتی بادی اولیه ای (sc-2005) β -actin که با محلول بلاکینگ به نسبت (۱:۱۰۰۰۰) مخلوط و رقیق شده است، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه شد. پس از اتمام مرحله قبل، کاغذ ۳ بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBST (تریس - HCl، NaCl، tween 20 و آب مقطر) شست و شو داده شد. سپس صفحه با آنتی بادی ثانویه (ab6721) Anti Rabbit با غلظت (۱:۱۰۰۰۰) برای تمام آنتی بادی های اولیه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در پایان این مرحله نیز صفحه سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBST شست و شو شد. جهت آشکارسازی باند پروتئینی مورد نظر، از کیت کمولومینس ECL advanced reagents شامل شیر بدون چربی و واکنش گرهای A و B استفاده شد. ابتدا واکنش گرهای A و B با نسبت ۱:۱ مخلوط شده و حجم نهایی محلول مذکور برای هر سانتی متر مکعب از صفحه ۰/۱ میلی متر در نظر گرفته شد، پس از شست و شوی نهایی مرحله قبل، آب اضافی گرفته و صفحه PVDF روی سلفون قرار داده شد و محلول کمولومینسانس با سمپلر روی نواحی باند مورد نظر ریخته شد، در سلفون گذاشته شد و درون کاست فیلم قرار گرفت.

برای مشاهده باند پروتئینی مورد نظر فیلم X-ray را بر کاغذ دارای پوشش نایلونی گذاشته و در کاست را می بندیم. پس از خارج کردن فیلم از کاست آن را ابتدا در محلول ظهور به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده تا باندها ظاهر شوند. سپس در آب، فیلم را به مدت ۲۰

ثانیه شسته و بعد از آن به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ثبوت تکان داده می‌شود. مجدداً فیلم را با آب جاری شسته و خشک شد، سپس لکه‌های ظاهر شده بر روی فیلم به وسیله نرم‌افزار Image J و آزمون‌های آماری به وسیله نرم‌افزار Prism8 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

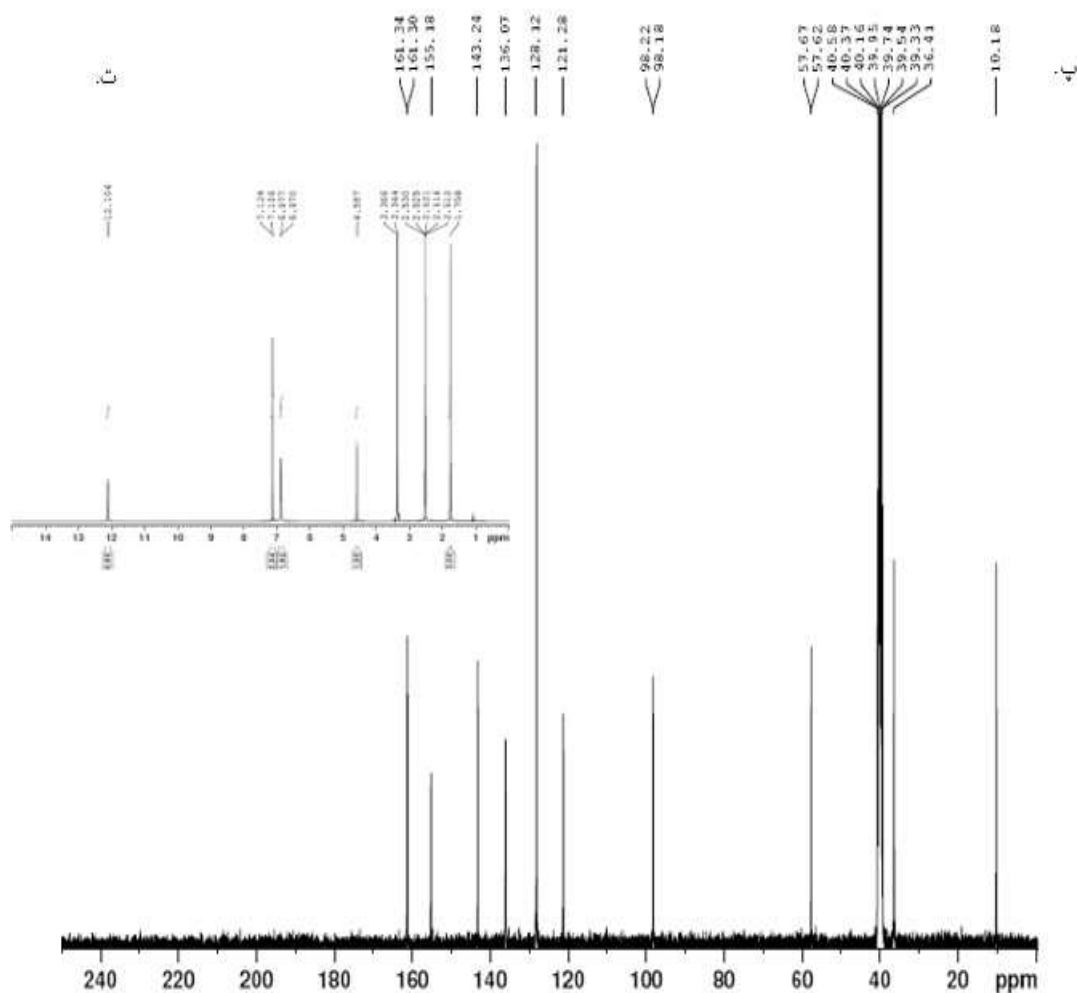
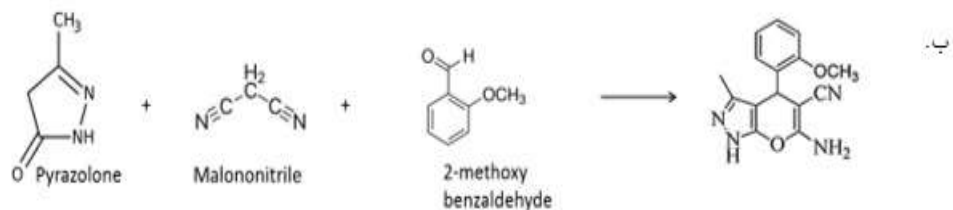
جهت بررسی و تأیید ساختار ترکیبات سنتز شده از روش‌های FT-IR و H-NMR و C-NMR استفاده شد. طیف حاصل از این روش‌ها نشان از تأیید سنتز صحیح ترکیبات دارد که در شکل ۱ طیف‌های مربوطه ارائه شده است.

بررسی سمیت سلولی ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 بر روی رده سلولی MCF-7، با استفاده از تست MTT انجام گرفت. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت، باعث مهار معنی‌دار رشد سلول‌ها به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.05$). به این ترتیب با افزایش غلظت ترکیبات سنتزی HN1 و HN2، درصد بقا به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲). هم‌چنین مقادیر IC_{50} ترکیبات HN1 و HN2 به ترتیب ۷/۴ و ۸/۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. به این ترتیب نتایج حاضر نشان داد که ترکیبات سنتزی، رشد و تکثیر سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز مهار نمود.

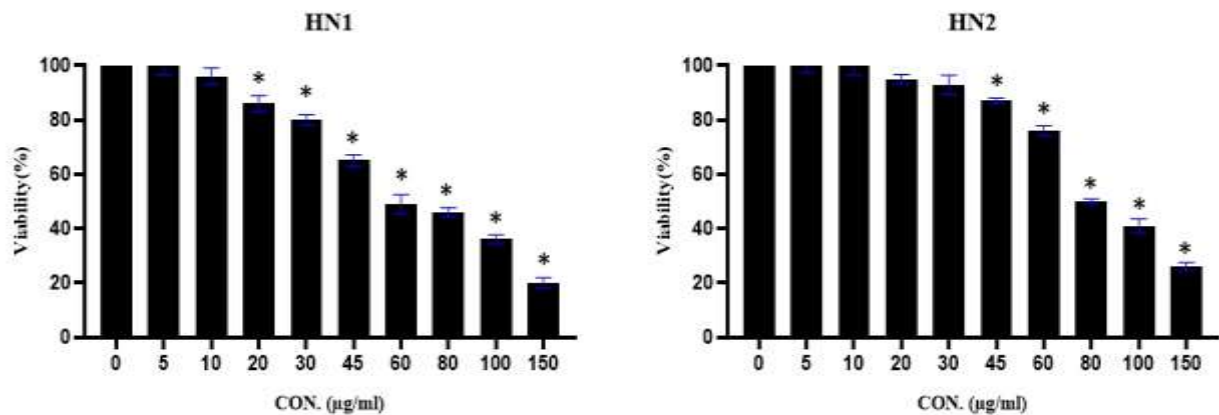
جهت بررسی اثرات آپوپتوتیک ترکیبات سنتزی HN1 و HN2، آنالیز میزان مهار بیان پروتئین Bcl-2 به عنوان یک فاکتور ضد آپوپتوزی در سلول‌های MCF-7، با روش وسترن بلات انجام گرفت، با استفاده از نرم‌افزار Image J میزان شدت باندها محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که هر دو ترکیب سنتزی باعث کاهش در میزان بیان پروتئین Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل (غلظت صفر ترکیبات)، شدند. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، ترکیب HN1 و HN2 به ترتیب در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار ۱۲ و ۳۰ درصدی بیان پروتئین Bcl-2 شد. در مقابل داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار ۳۰ درصدی بیان را نشان می‌دهد.

بحث

هدف قرار دادن انتخابی پروتئین‌های خانواده Bcl-2 می‌تواند پتانسیل قابل توجهی برای استراتژی‌های درمانی علیه بیماری‌های ناشی از تکثیر بیش از حد سلول یا مرگ سلول داشته باشد. به نظر می‌رسد که بتوان با ترکیباتی که مسیرهای مولکولی خاصی از قبیل مسیر فعال شدن آنزیم‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز را، مورد هدف قرار می‌دهند، درمان بدون عوارض جانبی را ایجاد کرد (۱۱). لذا هدف از این مطالعه سنتز و بررسی اثر مشتقات بر پایه پیرانو [۲،۳-C] پیرازول جهت القای آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی لنفوم سلول B2 در رده سلول سرطان سینه MCF-7 بود.

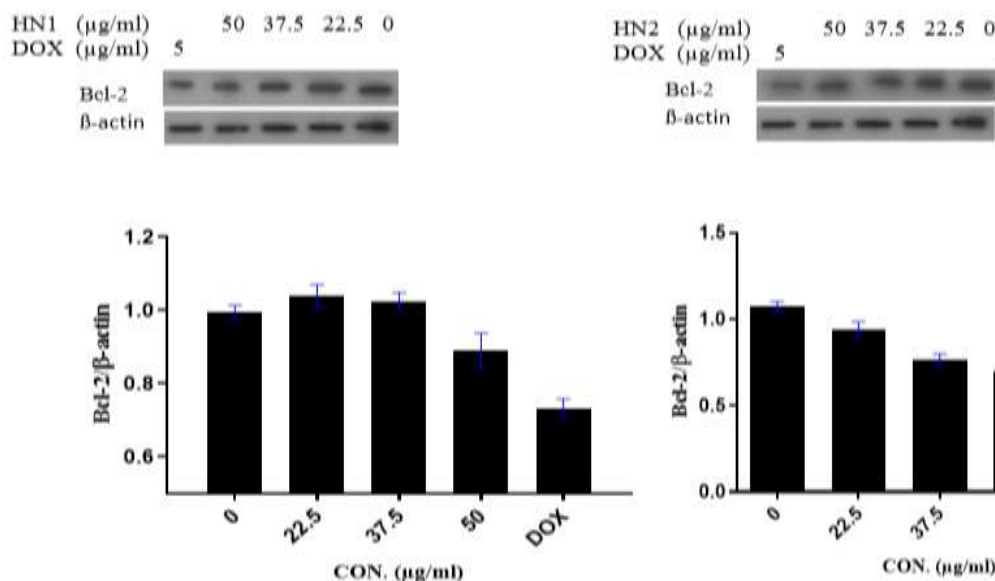


شکل ۱: مسیر سنتز و نایید سنتز ترکیبات سنتزی توسط روش NMR الف. مسیر سنتز ترکیب HN1 و ساختار آن، ب. مسیر سنتز ترکیب HN2 و ساختار آن، پ. طیف ^{13}C NMR ترکیب سنتزی HN1 و ت. طیف ^1H NMR ترکیب سنتزی HN1



شکل ۲: فعالیت ضد تکثیری ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 بر روی سلول‌های MCF-7 بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار. پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب HN1 و HN2 (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، درصد زیستایی سلول‌ها با استفاده از تست MTT

* $p < 0.05$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل است.



شکل ۳: بررسی میزان بیان پروتئین Bcl-2 نسبت به β-actin با روش وسترن بلات، در سلول‌های تیمار شده با ترکیبات سنتزی HN1 و HN2 در دامنه غلظت ۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر

میتوکندری هدایت می‌شود. هر دو مسیر منجر به فعال شدن یک آبشار پروتئازهای خاص به نام کاسپازها می‌شود که اعضای اصلی فرآیندهای آپوپتوزی

آپوپتوز یک فرآیند کنترل شده سیگنالینگ سلولی است که از طریق مسیر بیرونی گیرنده‌های مرگ در غشای سلولی و یا مسیر درونی وابسته به

پروتئین‌های پروآپوپتوزی مانند Bax و Bak است (۱۷). نقص آپوپتوزی ناشی از سرطان می‌تواند باعث مقاومت به داروها شود و آستانه مرگ سلولی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد، اثرات سیتوتوکسیک شیمی‌درمانی و پرتودرمانی را از بین می‌برند (۱۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اختلال در تنظیم آپوپتوز یکی از ویژگی‌های اساسی زیست‌شناسی سرطان است و بینش‌های جدید در زمینه درمان سرطان و طراحی دارو ارایه می‌دهد (۱۹). افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 از جمله راهکارهای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. Bax باعث فعال‌سازی میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C شود و منجر به فعال‌سازی آبشار کاسپاز می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲۰). برعکس Bcl-2 برای حفظ یکپارچگی غشای بیرونی میتوکندری مانع از آزاد شدن فاکتورهای پروآپوپتوزی می‌شود (۲۱). تعادل بین پروتئین‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 برای حفظ نفوذپذیری غشای میتوکندری (MMP)^(۲) حیاتی است (۲۲ و ۲۳). در این تحقیق فعالیت آپوپتوزی مشتقات سنتزی HN1 و HN2 بر پایه پیرازول روی رده سلول سرطان سینه انسان MCF-7 بررسی شد. مشتقات مختلف پیرازول با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی همانند؛ ضدتومور، ضدویروس، ضد میکروبی و ضد التهاب مشخص می‌شوند (۲۴ و ۲۵). همچنین پژوهش‌های

هستند (۱۳). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم مسیر درونی دارند و شامل چندین پروتئین پروآپوپتوزی مانند Bax، Bak می‌باشد که منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندری و انتشار سیتوکروم C به سیتوزول می‌شود که با فاکتور فعال کننده پروتئین‌های آپوپتوز (Apaf-1)^(۱) منجر به تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم، در نهایت باعث فعال‌سازی کاسپاز ۹، ۳، ۷ می‌شود که آپوپتوز را اجرا می‌کنند (۱۴). از آن جایی که میتوکندری نقش مهمی در مسیر سیگنالی مرگ سلولی مانند آپوپتوز دارد و مسیرهای آپوپتوز وابسته به میتوکندری به وسیله پروتئین‌های خانواده Bcl-2 که اثرات پرو و آنتی‌آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی دارد، تعادل نسبی پروتئین پروآپوپتوزی (Bax) و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی (Bcl-2) باعث حفظ هموستاز سلولی می‌شود. افزایش در نسبت Bax/Bcl-2 موجب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول می‌شود که منجر به فعال شدن کاسپازها و القای آپوپتوز می‌شود (۱۵). سیستم آپوپتوزی معیوب به عنوان یک عامل اصلی در سرطان‌زایی شناسایی شده است، که باعث ترویج سلول‌های توموری، آنژیوژنز و متاستاز می‌شود (۱۶).

مکانیزم‌های مولکولی مختلف در مهار آپوپتوز به وسیله سلول‌های سرطانی ایجاد می‌شود که این شامل بیان بیش از حد پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی مانند اعضای خانواده پروتئینی مهارکننده آپوپتوز (IAP) یا Bcl-2 و مکانیزم دیگر سرکوب

1-Apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1)
2-Mitochondrial membrane permeabilization

مختلف نشان داده که هتروسیکل‌های بر پایه پیرازول فعالیت قابل توجهی بر علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطان سینه دارند (۲۴ و ۲۵). ردی و همکاران اثر سیتوتوکسیک ترکیبات بر پایه پیرازول‌ها علیه سه رده سلولی سرطانی در انسان، ریه (A549)، سینه (MCF-7) و دهانه رحم (HeLa) با استفاده از تست MTT بررسی کردند. این ترکیبات طیف وسیعی از فعالیت ضد تکثیری را بر علیه رده‌های سلول سرطانی با مقادیر IC_{50} در دامنه $0.83-1.81$ میکرومولار را نشان دادند (۲۴). نتایج حاصل از تست MTT با تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تیمار شده با مشتقات مختلف پیرازولی مطابقت نشان داد. بسیاری از مشتقات پیرازول و بنزوایمیدازول باعث القای آپوپتوز را در رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف می‌شوند (۲۴-۲۶). این مشتقات به طور قابل توجهی سطوح پروتئین پروآپوپتوزی Bax را افزایش و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 را کاهش می‌دهد. محمد و همکاران اثرات سیتوتوکسیک، مشتقات جدید پیرازولی بر سلول‌های سرطانی A549، HCTG2 و HEPG2 را نشان دادند (۲۶). این مطالعه نشان داده که مشتق مورد مطالعه به طور قابل توجهی ژن کاسپاز ۳، ژن پروآپوپتوزی Bax و ژن سرکوب کننده P53 را القا و ژن آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 را سرکوب می‌کند (۲۶). استفان و همکاران اثر مشتقات پیرازولی را بر روی فاکتورهای پروآپوپتوزی (Bax) و آنتی‌آپوپتوزی (Bcl-2) در سلول‌های سرطانی K562 و C121 مورد مطالعه قرار دادند و نتایج نشان داد افزایش نسبت Bax/Bcl-2

در سلول‌های تیمار شده با ترکیبات سنتزی باعث القا در ایجاد منافذ در غشای میتوکندری، رهاسازی سیتوکروم c و در نهایت القای آپوپتوز می‌شود (۲۷). مشتقات پیرازول باعث کاهش بیان سورویوین در بعضی سلول‌های سرطانی می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده سورویوین با مقاومت در برابر پرتو درمانی و شیمی‌درمانی مرتبط است و مهار این پروتئین می‌تواند منجر به حساسیت بیشتر سلول‌های توموری به درمان‌های فعلی سرطانی شود (۲۸ و ۲۹). سان و همکاران نشان دادند که مشتقات هتروسیکلی پیرانو [۲-۳-c] پیرازول به نام AMDPC در شکل آزاد و متصل به PEG-PLGA توانایی مهار چرخه سلولی و القا آپوپتوز را در سلول‌های سرطان سینه BCAP-37 دارند (۳۰). در مطالعه حاضر دو ترکیب سنتزی جدید پیرازول HN1 (با دو حلقه پیرازولی حاوی گروه‌های CN- و NH₂-) و HN2 (با یک حلقه پیرازولی حاوی گروه‌های CN-، NH₂- و OCH₃-) بر روی سلول سرطان سینه MCF-7 مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا با استفاده از تست MTT اثرات مهارکنندگی ترکیبات HN1 و HN2 بر رشد و تکثیر سلول‌ها ارزیابی شد. نتایج تست MTT نشان داد ترکیبات HN1 و HN2 به ترتیب با IC_{50} ۷/۴ و ۸/۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد سلول‌های MCF-7 می‌شوند. که این میزان با IC_{50} ترکیب AMDPC به عنوان مشتق پیرازول (۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۱۸)، قابل مقایسه می‌باشد. نتایج روش وسترن بلات نشان دهنده کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 در سلول‌های

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی با کد ۲۵۸۵۸۶۳ از دانشگاه گیلان می باشد، که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه انجام شد.

تیمار شده با ترکیبات HN1 و HN2 در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین می باشد. آنالیز بیان Bcl-2 با استفاده از نرم افزار Image نشان دهنده کاهش ۱۲ و ۳۰ درصدی بیان به ترتیب در سلول های تیمار شده با ترکیبات HN1 و HN2 در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. محمد و همکاران میزان کاهش بیان ژن Bcl-2 در سلول های سرطان ریه A549 را ۷۸ درصد گزارش کردند.

محدودیت های این مطالعه شامل استفاده از سلول های طبیعی به عنوان کنترل، جهت بررسی اثر سمیت ترکیبات سنتز بر آنها بود. همچنین نیاز به مطالعه دیگر فاکتورهای مرتبط با مسیر داخلی آپپتوز می باشد، لذا پیشنهاد می شود از سلول های طبیعی جهت بررسی اثر سمیت ترکیبات سنتزی استفاده شود.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق به همراه پژوهش های موازی نشان دهنده القا مسیر داخلی آپپتوز به وسیله مشتقات پیرازول ها می باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر، پتانسیل القا آپپتوز دو ترکیب سنتزی HN1 و HN2 را در سلول های MCF-7 به واسطه مهار بیان Bcl-2 نشان می دهند. ترکیب HN2 با داشتن یک حلقه پیرازولی و گروه متوکسی عملکرد بهتری نسبت به ترکیب HN1 با دو حلقه پیرازولی و بدون گروه متوکسی نشان می دهد.

REFERENCES

- 1.Almeida CA, Barry SA. Cancer: basic science and clinical aspects. John Wiley & Sons 2011; 15-20.
- 2.DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 2014; 64(1): 52-62.
- 3.Amiri Z, Moghadam MF, Sadeghizadeh M. Anticancer effects of doxorubicin-loaded micelle on mcf-7 and mda-mb-231, breast cancer cell lines. *Journal of Research in Medical and Dental Science* 2018; 6(2): 298-304.
- 4.Ahmadi A, Ramazani R, Rezagholi T, Yavari P. Incidence pattern and spatial analysis of breast cancer in Iranian women: Geographical information system applications. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2018; 24(4): 360-367.
- 5.Rezaianzadeh A, Jalali M, Maghsoudi A, Mokhtari AM, Azgomi SH, Dehghani SL. The overall 5-year survival rate of breast cancer among Iranian women: A systematic review and meta-analysis of published studies. *Breast Disease* 2017; 37(2): 63-68.
- 6.Guo Y, Zhang Y, Yang X, Lu P, Yan X, Xiao F, et al. Effects of methylglyoxal and glyoxalase I inhibition on breast cancer cells proliferation, invasion, and apoptosis through modulation of MAPKs, MMP9, and Bcl-2. *Cancer Biology & Therapy* 2016; 17(2): 169-80.
- 7.Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2015; 22(6): 760-772.
- 8.Roy MJ, Vom A, Czabotar PE, Lessene G. Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL 2 family driven pathway. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171(8): 1973-1987.
- 9.Jamalzadeh L, Ghafoori H, Aghamaali M, Sariri R. Induction of apoptosis in human breast cancer mcf-7 cells by a semi-synthetic derivative of artemisinin: a caspase-related mechanism. *Iranian Journal of Biotechnology* 2017; 15(3): 157.
- 10.Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275(5303): 1129-1132.
- 11.Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381): 1322-1326.
- 12.Leila J, Hosein G, Reyhaneh S, Hanieh R, Jila N, Hajar H, Mahmoud Reza A. Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry* 2016; 4(1): 10-33453.
- 13.Obexer P, Ausserlechner MJ. X-linked inhibitor of apoptosis protein—a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Frontiers in Oncology* 2014; 4: 197.
- 14.Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar TR, Sharma S, Mishra A, Goldsmith G, et al. Novel BCL2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction. *Biochemical Pharmacology* 2017; 131: 16-28.
- 15.Reddy TS, Kulhari H, Reddy VG, Bansal V, Kamal A, Shukla R. Design, synthesis and biological evaluation of 1, 3-diphenyl-1H-pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 101: 790-805.
- 16.Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10(8): 561.
- 17.Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International* 2014; 150845: 2-13.
- 18.Pham NA, Jacobberger JW, Schimmer AD, Cao P, Gronda M, Hedley DW. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004; 3(10): 1239-1248.
- 19.Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011; 30(1): 87.
- 20.Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar TR, Sharma S, Mishra A, Goldsmith G, et al. Novel BCL2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction. *Biochemical Pharmacology* 2017; 131: 16-28.
- 21.Cory S, Adams JM. A joint odyssey into cancer genetics. *Annual Review of Cancer Biology* 2019; 3: 1-19.

22. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell* 2010; 37(3): 299-310.
23. Chien CC, Wu MS, Shen SC, Ko CH, Chen CH, Yang LL, Chen YC. Activation of JNK contributes to evodiamine-induced apoptosis and G2/M arrest in human colorectal carcinoma cells: a structure-activity study of evodiamine. *PloS One* 2014; 9(6): e99729.
24. Reddy TS, Kulhari H, Reddy VG, Bansal V, Kamal A, Shukla R. Design, synthesis and biological evaluation of 1, 3-diphenyl-1H-pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 101: 790-805.
25. Czarnomysy R, Surazyński A, Muszynska A, Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K. A novel series of pyrazole-platinum (II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2018; 33(1): 1006-1023.
26. Mohamed MS, Abdelhamid AO, Almutairi FM, Ali AG, Bishr MK. Induction of apoptosis by pyrazolo [3, 4-d] pyridazine derivative in lung cancer cells via disruption of Bcl-2/Bax expression balance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2018; 26(3): 623-629.
27. Stefanos NM, Toigo J, Maioral MF, Jacques AV, Chiaradia-Delatorre LD, Perondi DM, et al. Synthesis of novel pyrazoline derivatives and the evaluation of death mechanisms involved in their antileukemic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2019; 27(2): 375-382.
28. Zaffaroni N, Pannati M, Diadone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005; 9(2): 360-372.
29. Lyu H, Huang J, He Z, Liu B. Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. *Science China Life Sciences* 2018; 61(7): 808-814.
30. Sun X, Zhang L, Gao M, Que X, Zhou C, Zhu D, Cai Y. Nanoformulation of a novel pyrano [2, 3-c] pyrazole heterocyclic compound amdpc exhibits anti-cancer activity via blocking the cell cycle through a p53-independent pathway. *Molecules* 2019; 24(3): 624.

Synthesis of Pirano-Based Piranazole-based Compounds to Induce Apoptosis by Reducing the Expression of Anti-Apoptotic Protein B2 Cell Lymphoma Protein in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Category

Shahriyari-Nejad H¹, Pourmohsen N¹, Ghafouri H^{1*}, Zareie S¹, Sharifi R², Mahmoodi N²

¹Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran, ²Department of Chemistry, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 17 Aug 2019 Accepted: 02 Des 2019

Abstract

Background & aim: B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) is a potential target for tumor treatment. The inhibition of the Bcl-2 production is research target of attraction in the field of anti-cancer drug development. The present study aimed to evaluate the inhibitory effects of novel pyrazole derivatives on Bcl-2 expression in human breast cancer cell line MCF-7.

Methods: In the present in vitro experimental study, the newly synthesized substances were screened against breast Aden carcinoma (MCF-7). The Western-blot analysis was carried out to study signaling pathways of MCF-7 breast cancer cells. The levels of apoptosis-related protein (Bcl-2) were evaluated by western blot analysis and changes in its expression were confirmed. Data were analyzed using one-way ANOVA, and independent t-test.

Results: The compounds HN1 and HN2 significantly inhibited the proliferation of human breast cancer cells. The compounds HN1 and HN2 inhibited the growth of MCF-7 cells with IC₅₀ values of 7.4 µg/ml and 8.68 µg/ml, respectively. In addition, compounds HN1 and HN2 (22.5-50 µg/ml) significantly inhibited the anti-apoptotic Bcl-2 protein production. The compound HN2 significantly inhibited Bcl-2 expression in a concentration-dependent manner, corresponding 24% at 37.5 µg/ml, 30% at 50 µg/ml. Also compound HN1 at the same concentrations inhibited Bcl-2 expression by 12%, 0% at 50 and 37.5 µg/ml in MCF-7 cells, respectively.

Conclusion: HN2 could suppress the viability of MCF-7 cells and induce apoptosis in breast cancer cells by down-regulation of anti-apoptotic factor, Bcl-2. These results revealed that the potential inhibitory effect of HN2 against growth of MCF-7 human breast cancer cells might be associated with induction of apoptosis through Bcl-2 protein dependent pathway. The present results suggest that HN2 has a promising potential to be used as a valuable chemo preventive agent.

Keywords: Pyrazole, Apoptosis, MCF-7 cells, Bcl-2

***Corresponding author:** Ghafouri H, Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.

Email: H.ghafouri@guilan.ac.ir

Please cite this article as follows:

Shahriyari-Nejad H, Pourmohsen N, Ghafouri H, Zareie S, Sharifi R, Mahmoodi N. Synthesis of Pirano-Based Piranazole-based Compounds to Induce Apoptosis by Reducing the Expression of Anti-Apoptotic Protein B2 Cell Lymphoma Protein in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Category. Armaghane-danesh 2020; 25(1): 40- 54.