تأثیر ماده نیتروچالکون بر سرطان سینه القا شده در موش‌های نژاد BALB/c

فاطمه صبری[۱]، پریچهره یغمایی[۱*]، آزاده ابراهیم حبیبی[۲]، شیوا ایرانی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۹

چکیده

سرطان رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها می‌باشد و سرطان سینه یکی از انواع آن بوده که روش اصلی درمان آن شیمی درمانی است که با عوارض جانبی همراه می‌باشد. امروزه استفاده از مواد طبیعی مانند چالکون‌ها در درمان سرطان گسترده شده است. هدف این بررسی القای آپوپتوز با داروهای نیتروچالکون در سلول‌های سرطان سینه 4T1 و روی موش‌های نژاد Balb/c بوده است. سمیت دارو با روش MTT assay در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت و غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میکرومولار سنجیده شد. پس از تیمار موش‌های توموری، بررسی‌های بافتی‌شناسی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام گرفت. سپس معناداری نتایج با SPSS و ANOVA با $p < ۰/۰۵$ بررسی گردید. نتایج سنجش MTT در نیتروچالکون، میزان سمیت ۵۰ درصد دارویی را در زمان ۲٤ ساعت در تمامی غلظت‌ها نشان داده است. در بررسی هیستولوژیک، آپوپتوز نیز مشاهده شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که داروهای نیتروچالکون می‌توانند گزینه‌ی مناسبی برای درمان سرطان سینه باشند.

کلمات کلیدی: نیتروچالکون، سرطان سینه، موش Balb/c

مقدمه

تمام بدن از سلول ساخته شده است. به‌طور معمول، سلول‌ها تکثیر می‌شوند تا جانشین سلول‌های پیر و مرده گردند و یا اینکه در بچه‌ها باعث رشد بدن شوند. این تکثیر و ازدیاد سلول‌ها تابع قوانین خاصی است؛ بنابراین سلول‌ها به اندازه لازم زیاد می‌شوند. در هنگام بروز سرطان، رشد و تکثیر سلول‌ها از مهار و کنترل خارج می‌شود و تعداد بیش از حد سلول جدید ایجاد می‌شود که به‌تدریج، منجر به ایجاد توده یا تومور سرطانی می‌گردند (۱).

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن به صورت غیرعادی تقسیم و تکثیر شده و بافت‌های سالم را نابود می‌کند بنابراین عامل مرگ در بسیاری از کشورها است. مشخصات اصلی سلول‌های سرطانی تکثیر خارج از کنترل، جلوگیری از آپوپتوز، حمله کردن و متاستاز است. با وجود شیمی درمانی‌های پیشرفته عامل سایتوتوکسیک مفید کلینیکالی شایسته وجود ندارد که به‌طور انتخابی سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار دهد. مرگ سلولی همان آپوپتوزاست که برای هموستازی بافت ضروری است در واقع در جایی که هموستاز انجام می‌شود تعادل بین تکثیر سلول و مرگ سلولی ایجاد می‌شود. داروهای شیمی-درمانی عواملی هستند که به طور انتخابی باعث مرگ سلول‌های توموری می‌شوند. عوامل مستعدکننده شامل سن بالا، سابقه فامیلی، اولین حاملگی بالای سن ۳۰

سال، مصرف غذاهای حاوی چربی زیاد و... هستند. بسیاری از این بیماران در مراحل اولیه علائم بالینی چندانی نداشته و بیماری به وسیله معاینه جراح و انجام ماموگرافی مشخص می‌شود. از نظر محل بروز سرطان در پستان، بیشترین قسمتی از پستان که امکان بروز سرطان دارد ربع فوقانی خارجی پستان‌هاست (۱).

به منظور درمان سرطان سینه از گزینه‌های درمانی مثل شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی استفاده می‌شود. اگرچه گزینه‌های درمانی معمول از قبیل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در دهه گذشته پیشرفت داشته‌اند اما درمان سرطان هنوز به حد مطلوب نرسیده است (٤).

در حال حاضر روش‌های درمانی متعددی برای مبتلایان به سرطان وجود دارد که بستگی به نوع سرطان، وضعیت بیماری در شروع درمان و سن دارد. از جمله این روش‌ها می‌توان به جراحی، پرتو درمانی، شیمی‌درمانی، ژن درمانی و غیره اشاره کرد (۹).

مقاومت سلول‌های سرطان سینه به روش‌های شیمی درمانی موجود، یک مانع اصلی برای موفقیت درمان می‌باشد. از آنجا که داروهای شیمی درمانی علاوه بر سلول‌های سرطانی روی سلول‌های سالم نیز اثر می‌گذارند، بنابراین اثرات جانبی شدیدی در بیماران دیده می‌شود (٤، ٥، ١٢).

گیاهان در طی رشد طبیعی و پاسخ به شرایط استرس (زخم‌ها، حمله آفات، اشعه UV و ...) ترکیبات فنلی از خود سنتز می‌نماید (۳، ۷). این ترکیبات نظر شیمیایی به سه گروه، پلی‌فنل‌ها، فنل‌های ساده و گروه متفرقه تقسیم می‌شوند. پلی فنل‌ها در ایجاد رنگ گل‌ها، میوه‌ها و سبزیجات نقش داشته و همچنین اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان کارا و مناسب به حساب می‌آیند.

پلی‌فنل‌ها شامل دو کلاس بزرگ تانن‌ها و فلاونوئیدها هستند. تانن‌ها، ترکیبات فنلی تلخ بوده متصل شونده به پروتئین‌ها هستند. فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی با ساختار ۱۵ کربنی به‌صورت $C_٦-C_٣-C_٦$ با گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک بوده که شامل فلاون‌ها، فلاونول‌ها، ایزوفلاون‌ها و چالکون‌ها می‌باشند. کاربرد فنل‌ها با توجه به نوع ساختار و ترکیب شیمیایی به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی در درمان بعضی از بیماری‌ها مثل سرطان، مالاریا است (٦).

چالکون‌ها گروهی دیگر از ترکیبات فنلی هستند که دارای الگوی متفاوتی بر روی دو حلقه‌ی آروماتیک 1, 3- diphenyl-2-propen-1-one می‌باشند. این‌ها کلاس مهمی از محصولات طبیعی و جزو خانواده‌ی فلائنوییدها هستند که به عنوان عوامل فعال بیولوژیکی شامل عوامل ضدالتهاب و ضد موتاژن شناخته شده‌اند (۱۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱٤ بر روی مشتقات چالکونی صورت گرفته است اثرات سمیت این خانواده بر روی سلول‌های سرطانی اثبات شده است (۸).

فلاونوئیدهای رژیم غذایی به عنوان عوامل بازدارنده شیمیایی جلب توجه می‌کند. چالکون‌ها به طور فراوان از سرخس‌ها تا گیاهان عالی یافت می‌شوند. ترکیبات فنولی دارای اثرات بسیار مفیدی بر سلامت است و خاصیت ضدالتهابی، ضدتکثیری و فعالیت‌های ضدویروسی دارد. بنابراین فلاونوئیدها جزء اصلی رژیم غذایی انسان است.

ساختمان این آنتی‌اکسیدان‌ها شامل بیش از ٤ هزار ساختار عملکردی (moiety) است، بنابراین احتمالاً از این ترکیبات در درمان سرطان می‌توان سود برد. چالکون‌ها در بیشتر سرطان‌های انسانی به عنوان عامل ضدسرطان کاربرد دارد و نیز می‌توانند باعث القای آپوپتوز و تنفس میتوکندری شوند. یکی دیگر از ترکیبات چالکونی نیتروچالکون است که دارای فرمول

شیمیایی $C_{15}H_{11}NO_3$ است و ویژگی‌های آن در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی نیتروچالکون (۱۷).

ویژگی	٤- نیتروچالکون
نام مترادف	چالکون، ٤- نیترو- (6CI,7CI,8CI)؛ ۱- (٤- نیتروفنل)- ۳- اکسو- ۳- فنل پروپن؛ ۱- فنیل- ۳- (٤- نیتروفنل) – ۲ – پروپن؛ ۳- (٤- نیتروفنل) – ۱- فنل- ۲- پروپن- ۱- یک؛ ۳- (نیتروفنل-p)- ۱- فنل- ۲- پروپن- ۱- یک؛ ٤- نیتروچالکن؛ ٤- نیترواستریل فنل کتون؛ NSC ۳۳۸۳؛ NSC ٦٣٦٩٣٦؛ نیتروبنزیلیدنا کتوفنون- P؛ نیتروچالکون- P؛ نیترواستریل فنل کتون- P
فرمول	C15H11 N O3
وزن مولکولی	253.27
چگالی	1.255g/cm3
نقطه جوش	399.2°Cat760mmHg

مواد و روش کار

در این مطالعه از سلول‌های بافت اپیتلیالی سینه موش استفاده شده است که ویژگی‌های این رده‌ی سلولی (4T1) در جدول ۲ توضیح داده شده است. سلول‌های مورد مطالعه در محیط RPMI1640 حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی رشد داده می‌شود. سلول‌ها در زمان رشد متابولیت‌های اسیدی تولید می‌کنند که باعث تغییر رنگ تدریجی محیط کشت از رنگ ارغوانی به زرد می‌گردد، به همین دلیل معمولاً هر ٤٨-٢٤ ساعت یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌گردد.

روش‌های متعددی جهت سنجش غیرمستقیم میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها وجود دارد. اغلب این روش‌ها میزان فعالیت یک آنزیم سلولی را درون سلول زنده اندازه‌گیری می‌کنند.

یکی از شناخته‌شده‌ترین این روش‌ها آزمون MTT است. تست MTT، آزمونی کمی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلول‌ها در مواجه با عوامل مختلف و تعیین میزان سمیت این عوامل بر روی سلول‌ها می‌باشد. اساس این روش بر پایه توانایی آنزیم ردوکتاز میتوکندریایی سلول‌های زنده در احیاء و تبدیل حلقه‌های تترازولیوم MTT زرد رنگ به کریستال‌های نامحلول و بنفش فرمازان است که قادر به عبور از غشاء سلول نیستند، می‌باشد. سپس این کریستال‌ها توسط شوینده‌ای به فرم محلول در می‌آیند (۱۱).

ضمن انجام تست MTT واکنشی مطابق شکل ۲ زیر در سلول‌های زنده رخ می‌دهد.

تراکم نوری محلول حاصل را می‌توان با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج nm۵۷۰ اندازه‌گیری کرد. واکنش احیاء که در بالا مطرح شد تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد، مقدار عددی بدست آمده به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده در تناسب است. در این سنجش میزان فرمازان تولید شده توسط سلول‌های تیمار شده را با میزان فرمازان تولید شده توسط سلول‌های کنترل که تیمار خاصی دریافت نکرده‌اند مقایسه می‌نمایند (۱۲).

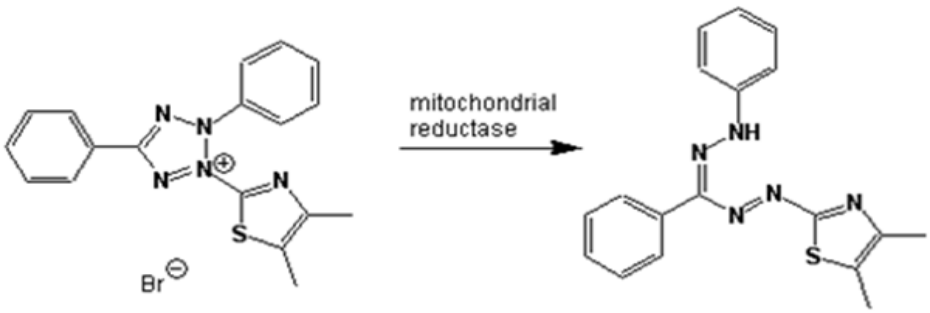
وزن مولکولی ماده نیتروچالکون معادل ۲۵۳/۲۵ میکرومول می‌باشد. یعنی هر مول از این ماده معادل ۲۵۳/۲۵ گرم از این ماده است. در تهیه‌ی غلظت‌های

دارویی برای کاهش میزان اشتباه ابتدا محلولی با غلظت بالاتر دارویی مثلاً ۲۰۰ میکرومول بر لیتر تهیه می‌شود. داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل واقع می‌شوند و اختلاف در سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

بررسی هیستولوژی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. در روش In vivo پس از القا سرطان بافت پستان را به لحاظ ساختار هیستولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می‌دهیم. سلول های زنده و سایز تومور نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. قبل از رنگ‌آمیزی، لام‌ها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱تا ۲ ساعت در فور به جهت دپارافینه شدن قرار داده شد و پس از حذف گزیلل و الکل سلول‌ها، از محلول هماتوکسیلین هاریس جهت رنگ آمیزی برش های بافتی استفاده شد. جهت دائمی کردن نمونه‌ها از چسب انتلان بین لام و لامل استفاده گردید و سپس لام‌ها به مدت ۱۲ ساعت در هوای آزاد قرار گرفت تا کاملا خشک شوند.

جدول ۲- شناسنامه رده سلولی 4T1 (۱٦)

ارگانیسم	عضله موش
نژاد موش	BALB/cfC3H
بافت درگیر	غده پستانی
بیماری	این تومور از سلول‌های مرحله ۵ سرطان سینه حیوانی است.
نوع بافت	اپتیلیال
ویژگی‌های رشد	به هم چسبیده



MTT فرمازان

شکل ۱- واکنشی که ضمن انجام تست MTT در سلول‌های زنده رخ می‌دهد.

نتایج

نتایج حاصل از MTT داروی نیتروچالکون در زمان‌های مختلف: پس از تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی و گذشت ۲٤ ساعت از کاشتن آنها در پلیت ۹٦ خانه سلول‌ها تحت تیمار غلظت‌های ۵۰، ٤۰، ۳۰، ۲۰ میکرومولار از داروی نیتروچالکون قرار گرفتند. در

ادامه تست MTT برای زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت انجام گرفت.

نتایج حاصل از MTT داروی نیتروچالکون در زمان ۲٤ ساعت: پس از ۲٤ ساعت تیمار با غلظت-های مختلف نیتروچالکون در غلظت‌های ۵۰، ٤۰، ۲۰ سمیت ۵۰٪ دارویی مشاهده گردید؛ اما بیشترین سمیت مربوط به دوز دارویی ۵۰ میکرومولار بوده است از نظر آماری داده‌ها دارای توزیع نرمال بودند و نتیجه‌ی معنی‌داری را نشان داده‌اند. در این تست به ازای نمونه‌ی کنترل تیمار نشده، نمونه‌ی تیمار شده با داروی نیتروچالکون با غلظت‌های متفاوت سه تکرار در نظر گرفته شد.

در این تست میزان ۵DMSO درصد به عنوان حلال دارو و غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میکرومولار از دارو اعمال گردید. سطح معنی‌داری $p<$ ۰/۰۵ با آنالیز SPSS و ANOVA انجام شد که با * نشان داده شده است (نمودار ۱).

آزمون MTT داروی نیتروچالکون در زمان ٤۸ ساعت: پس از ٤۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف نیترو چالکون در تمامی غلظت‌ها سمیت ۵۰٪ دارویی مشاهده گردید اما بیشترین سمیت مربوط به دوز دارویی ۲۰ میکرومولار بوده است. از نظر آماری داده-ها دارای توزیع نرمال بودند و نتیجه‌ی معنی‌داری را نشان داده‌اند (نمودار ۲).

در این تست به ازای نمونه‌ی کنترل تیمار نشده، نمونه‌ی تیمار شده با داروی نیترو چالکون با غلظت-های متفاوت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این تست میزان ۵DMSO٪ به عنوان حلال دارو وغلظت‌های ۵۰، ٤۰، ۳۰، ۲۰ uM از دارو اعمال گردید. سطح معنی‌داری $p <$ ۰/۰۵ با آنالیز SPSS و ANOVA انجام شد که با * نشان داده شده است.

نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین بدون تیمار دارویی: شکل ۳ مربوط به موش‌هایی است که هیچ گونه دارویی را دریافت نکرده‌اند. در این موش‌ها آپوپتوز رخ نداده است. در این بررسی رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده شده است و هیچ گونه مرگ سلولی آپوپتوزی رخ نداده است.

نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین پس از تیمار با نیتروچالکون: در این مطالعه میزان ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی نیتروچالکون به موش‌ها تجویز گردید و در نهایت مرگ آپوپتوزی در موش-های توموری دیده شد.

در این بررسی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین استفاده شده است و مرگ سلولی آپوپتوزی با فلش نشان داده شده است. میزان مصرفی دارو در این موش‌ها برابر با ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است. موش‌ها میزان ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی نیتروچالکون دریافت کرده‌اند.

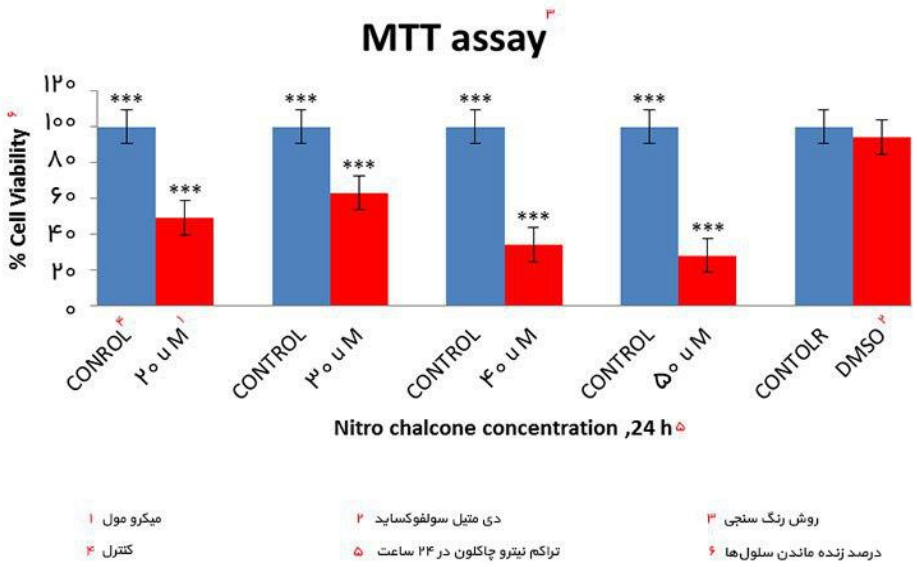
مطالعات In vivo: موش‌های خریداری شده سرطانی شده و پس ایجاد تومور در آنها تحت تیمار دارویی با نیتروچالکون قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین بدون تیمار دارویی: تصاویر مربوط به موش‌هایی می‌باشد که هیچگونه دارویی را دریافت ننموده‌اند. در این موش‌ها آپوپتوز رخ نداده است. در این بررسی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده شده است و هیچ گونه مرگ سلولی آپوپتوزی رخ نداده است (شکل ۳).

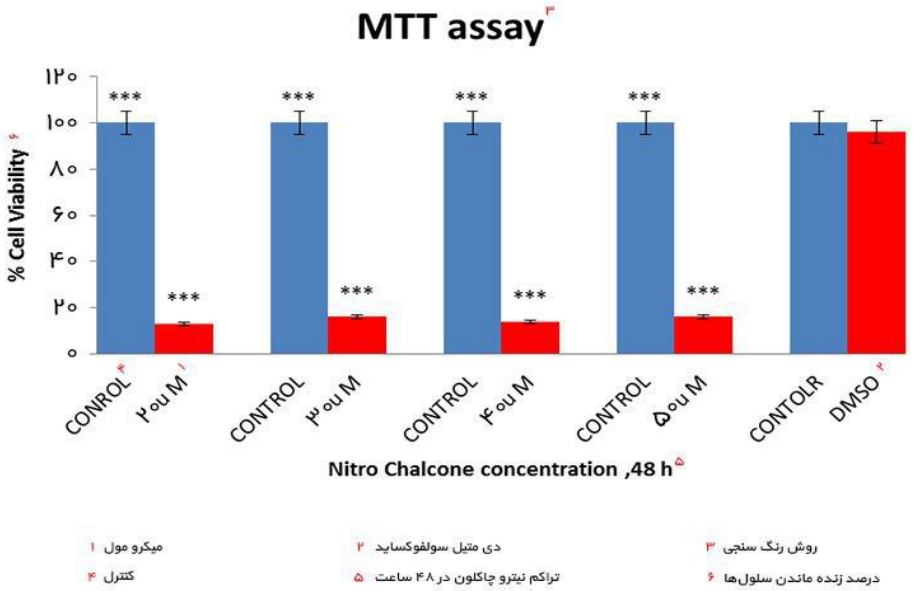
نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین پس از تیمار با نیتروچالکون در این مطالعه میزان ۱۲ میلی-گرم بر کیلوگرم داروی نیتروچالکون به موش‌ها تجویز گردید و در نهایت مرگ آپوپتوزی در موش-های توموری دیده شد.

در شکل ٤ مرگ سلولی آپوپتوزی با فلش نشان داده شده است. میزان مصرفی دارو در این موش‌ها برابر با ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است. موش‌ها میزان ۱۲

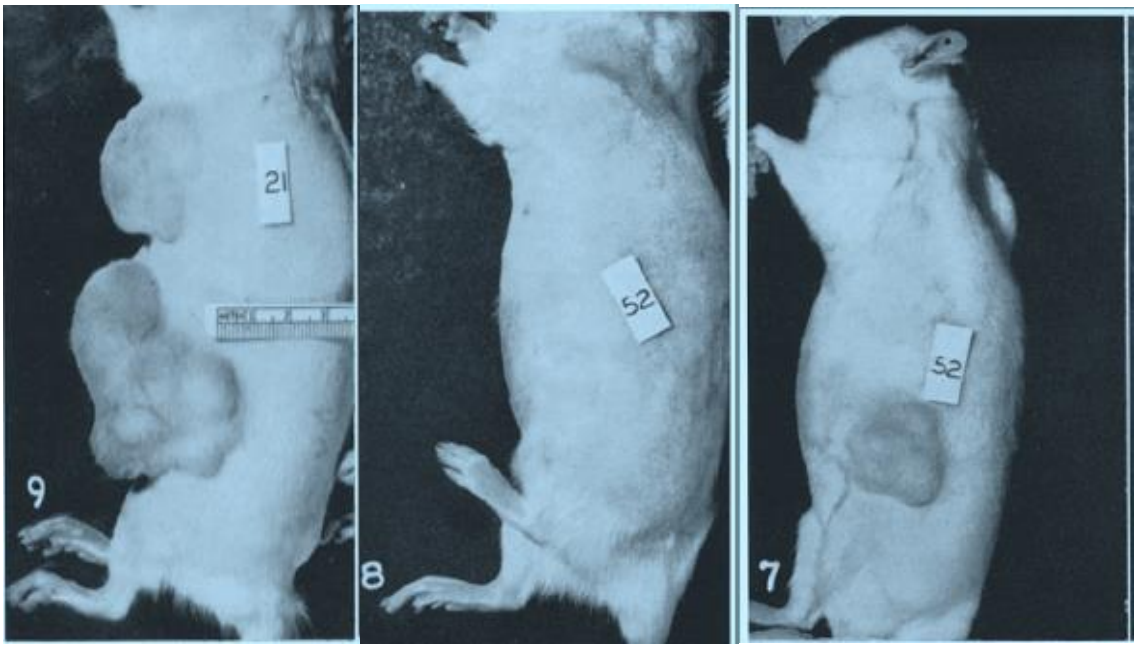
میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی نیتروچالکون دریافت نموده‌اند.



نمودار ۱- نتایج تست MTT مربوط به تیمار ۲٤ ساعت سلول‌های4T1 بر اساس تغییرات غلظت داروی نیتروچالکون (محور افقی) و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه‌ی تیمار شده با داروی نیتروچالکون (محور عمودی).

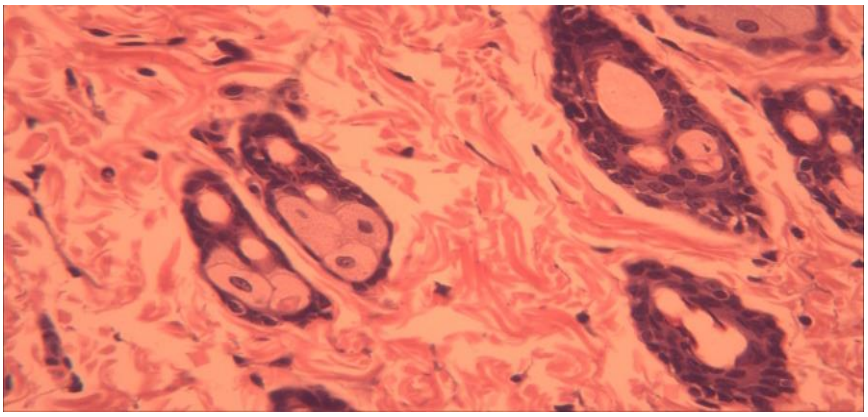


نمودار ۲- نتایج تست MTT مربوط به تیمار ٤٨ ساعت سلول‌های 4T1 بر اساس تغییرات غلظت داروی نیتروچالکون (محور افقی) و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه‌ی تیمار شده با داروی نیترو چالکون (محور عمودی).

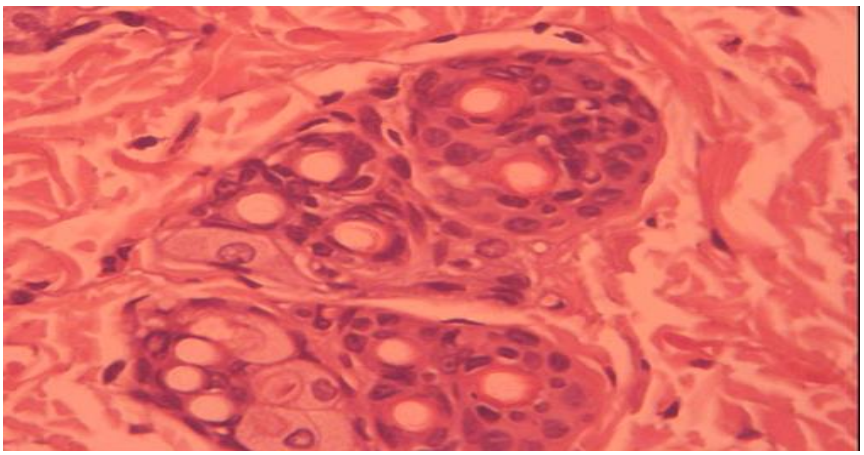


۳ ۲ ۱

شکل ۲- موش‌های مورد استفاده در این بررسی به ترتیب: ۱) موش سالم و غیرسرطانی.۲ و ۳) موش با تومور سرطانی سینه



شکل ۳- مقطع بافت سینه در موش‌های بدون درمان دارویی با بزرگ‌نمایی × ٤٠.



شکل ٤- مقطع بافت سینه در موش‌های دریافت‌کننده‌ی نیتروچالکون با بزرگ‌نمایی × ٤٠.

بحث

در این مطالعه به بررسی اثر نیتروچالکون پرداخته شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱٤ بر روی مشتقات چالکونی صورت گرفته است اثرات سمیت این خانواده بر روی سلول‌های سرطانی اثبات شده است (۸).

در یک پژوهش که در سال ۲۰۰۷ در in vivo و in vitro با تیمار ترانس‌چالکون ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام گرفت سمیت مناسب این دارو مشاهده گردید و نتایج حاصل از بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات مرگ سلولی آپوپتوزی را تأیید نمود (۱٤).

در مطالعه‌ی انجام گرفته شده بر روی نیتروچالکون نتایج تست MTT سمیت مناسب این دارو (IC۵۰) را بر روی رده‌ی سلولی4T1 نشان داده است که نشان-دهنده‌ی توانایی نیترو چالکون در القای سیگنال‌های مرگ در شرایط In vitro است؛ اما در این مطالعه نتایج حاصل از دارو در زمان ۲٤ ساعت مؤید سمیت مناسب‌تر داروی نیتروچالکون با غلظت ۵۰ میکرومولار بوده است (سمیت ۷۵٪). در زمان ٤۸ ساعت داروی نیتروچالکون با دوز دارویی ۲۰ میکرومولار بیشترین سمیت را داشته است از آنجایی که یکی از مسایل عمده در درمان‌های دارویی کاهش میزان دوز مصرفی برای کاهش هزینه‌های درمانی و کاهش اثرات جانبی است با توجه به نتایج حاصل از این بررسی می‌توان گفت، نیتروچالکون گزینه‌ی مناسب‌تری است زیرا در دوز مشابه سمیت بیشتری را بر روی رده‌ی سلولی سرطانی سینه نشان داده است.

به طور کلی بسیاری از داروهای شیمیایی که به منظور شیمی درمانی سرطان به کار برده می‌شوند، اغلب سبب تغییراتی در فرایند تقسیم سلولی شده و تکثیر و تمایز سلول سرطانی متوقف می‌شود. این امر به طرق مختلف از جمله القای آپوپتوز، تغییر ساختار DNA، مهار توپوایزومرازها، تیروزین کینازها، مهار تقسیم میتوز، مهار رونویسی، مهار همانندسازی و غیره انجام می‌گیرد (۲، ۹).

در بررسی که بر روی رده‌های مختلف سلولی در In vivo انجام گرفت. پس از تیمار با نیتروچالکون مهار رشد سلولی و نیز سمیت معادل IC50 دیده شد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر، تیمار با ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتروچالکون در شرایط in vivo و in vitro انجام گرفت و سمیت مناسب این دارو مشاهده گردید. نتایج ایمونوهیستوشیمی آپوپتوز را تایید نمود. به علت استفاده‌ی دوز کمتر نیتروچالکون می‌توان گفت این ساختار نسبت به ساختارهای مورد بررسی در مطالعات پیشین مناسب‌تر بوده است.

منابع

۱. کاویانی.، ا و همکاران. ۱۳۸۹. راهنمای جامع بیماری-های پستان، مرکز تحقیقات سرطان پستان جهاد دانشگاهی، ص: ۵۰-۱

2. Abeloff M.D., Armitage J.O., Niederhuber J.E., Kastan M.B., McKenna W.G., 2004. Review of Clinical Oncology. Saunders, 2224 pp.

3. Aggarwal B.B., Vijayalekshmi R.V., Sung, B., 2009. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, 15(2): 425-430.

4. Aljarrah K., Mhaidat N.M., Al-Akhras M.A.H., Aldaher A.N., Albiss B.A., Aledealat K., Alsheyab F.M., 2012. Magnetic nanoparticles sensitize MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *World Journal of Surgical Oncology*, 10(1): 62.

5. Cho K., Wang X.U., Nie S., Shin D.M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5): 1310-1316.

6. Ferreira J.F., 2009. Artemisia species in small ruminant production: their potential antioxidant and anthelmintic effects. In Appalachian Workshop and Research Update: Improving small ruminant grazing practices; Morales, M., Ed.; Mountain State University/USDA: Beaver, USA, pp: 53-70.

7. George T.W., Niwat C., Waroonphan S., Gordon M.H., Lovegrove J.A., Paterson E., 2007. Effects of chronic and acute fruit and vegetable juice consumption on cardiovascular disease risk factors. *In II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables-FAVHEALTH*, 841: 201-206.

8. Jardim G.A., Guimarães T.T., Maria do Carmo F.R., Cavalcanti B.C., de Farias K.M., Pessoa C., Gatto C.C., Nair, D.K., Namboothiri I.N., da Silva Júnior E.N., 2015. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. *Medicinal Chemistry Communication s*, 6(1): 120-130.

9. Li J.J., Gribble G. eds., 2006. Palladium in heterocyclic chemistry: a guide for the synthetic chemist (Vol. 26). Elsevier Science, 658 pp.

10. Mokhtari M.J., Motamed N., Shokrgozar M.A., 2008. Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell Biology International*, 32(8): 888-892.

11. Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.

12. Mousavi S.M., Montazeri A., Mohagheghi M.A., Jarrahi A.M., Harirchi I., Najafi M., Ebrahimi M., 2007. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *The Breast Journal*, 13(4): 383-391.

13. Pegram M.D., Pienkowski T., Northfelt D.W., Eiermann W., Patel R., Fumoleau P., Quan E., Crown J., Toppmeyer D., Smylie M., Riva, A., 2004. Results of two open-labels, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(10): 759-769.

14.Sasayama T., Tanaka K., Mizukawa K., Kawamura A., Kondoh T., Hosoda K., Kohmura, E., 2007. Trans-4-lodo, 4′-boranyl-chalcone induces antitumor activity against malignant glioma cell lines in vitro and in vivo. *Journal of Neuro-Oncology*, 85(2): 123-132.

15. Singh S., Sharma P.K., Kumar N., Dudhe R., 2011. A Review on a Versatile Molecule: Chalcone. Asian *Journal of Pharmaceutical and Biological Research (AJPBR)*, 1(3): 412- 418.

16. www.atcc.org.

17.www.lookchem.com/4-NITROCHALCONE/