

تأثیر ضد توموری کمپلکس‌های پالادیوم با مشتقات دی تیوکربوماتی بر روی ردهی سلولی سرطان مری (KYSE-۳۰)

دکتر نوروز نجف‌زاده^۱، شهرام هادی‌زاده^۲، دکتر محمد مازنی^۳، دکتر مجتبی امانی^۴، دکتر حسن منصوره ترشیزی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: برای درمان بدخیمی‌ها می‌توان از روش‌های جراحی، پرتو درمانی، دارو درمانی و یا ترکیبی از این روش‌ها استفاده کرد. دارو درمانی در بیماران سرطانی شامل شیمی درمانی، بیوتراپی و استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه برخی آنتی‌ژن‌های سلول بدخیم می‌باشد. از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سلول‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد، کمپلکس‌های فلزات سنگین می‌باشند و مطالعه‌ی حاضر نیز با هدف بررسی تأثیر ضد سرطانی کمپلکس‌های جدید پالادیوم بر روی ردهی سلولی سرطان مری انجام شد.

روش‌ها: کمپلکس‌های جدید پالادیوم به نام‌های μ -۳،۱- الکیلن بیس (دی‌تیوکربامات) بیس (۱،۱۰- فنانترویلین پالادیوم (II) نترات [که الکیلن می‌تواند پروپیلین (کمپلکس ۱)، بوتیلین (کمپلکس ۲) و یا اکتیلین (کمپلکس ۳) باشد] در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان سنتز شد و به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی آن در مقایسه با داروی سیس پلاتین بر روی ردهی سلول سرطانی مری (KYSE-۳۰)، از روش‌های MTT [$5,2\text{-diphenyltetrazolium bromide}$ -(2-yl - $5,4\text{-Dimethylthiazol}$ - 3)] و ارزیابی کلونی استفاده شد و همچنین برای بررسی نوع مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

یافته‌ها: IC₅₀ به دست آمده از تیمار سلول‌ها با کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ خیلی پایین‌تر از سیس پلاتین بود و همچنین رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید نشان داد که این ۳ کمپلکس جدید، اثرات سایتوتوکسیک خود را از طریق القای آپوپتوز سلولی اعمال می‌کنند. مقایسه‌ی تعداد کلونی‌های شکل گرفته بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های پالادیوم، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: اثرات ضد سرطانی این ۳ کمپلکس بر روی ردهی سلولی KYSE-۳۰ بیشتر از داروی سیس پلاتین می‌باشد و حتی استفاده از غلظت‌های پایین کمپلکس‌های پالادیوم می‌تواند باعث کاهش تعداد کلونی و القای مرگ سلولی از نوع آپوپتوز شود که می‌توان از آن در صورت انجام تحقیقات تکمیلی بعدی، به عنوان داروی جایگزین در درمان سرطان مری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: ردهی سلولی KYSE-۳۰، کمپلکس‌های جدید پالادیوم، کلونی، آپوپتوز، نکروز

ارجاع: نجف‌زاده نوروز، هادی‌زاده شهرام، مازنی محمد، امانی مجتبی، منصوره ترشیزی حسن. تأثیر ضد توموری کمپلکس‌های پالادیوم با مشتقات دی تیوکربوماتی بر روی ردهی سلولی سرطان مری (KYSE-۳۰). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۴): ۱۱۴۱-۱۱۲۹

- ۱- استادیار، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۳- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۴- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۵- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

Email: shahramhadizadeh@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: شهرام هادی‌زاده

مقدمه

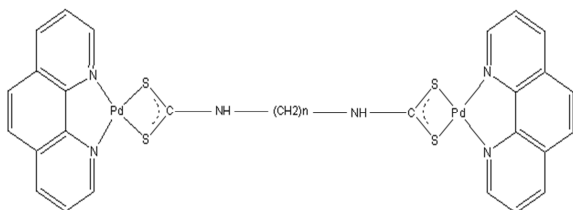
سرطان مری یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در دنیا می‌باشد. این سرطان هشتمین سرطان شایع و ششمین علت منجر به مرگ ناشی از سرطان در جهان است. سرطان مری به دو نوع اصلی آدنوکارسینومای مری و آدنوکارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری تقسیم‌بندی می‌شود که کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری شایع‌ترین آن‌ها است (۱-۳). در بین سفید پوستان کشور آمریکا میزان بروز این سرطان در آقایان حدود ۳ برابر خانم‌ها می‌باشد (۴). استعمال دخانیات و مصرف الکل از عوامل اصلی در ابتلا به این سرطان می‌باشند (۵).

برای درمان بدخیمی‌ها می‌توان از روش‌های جراحی، پرتو درمانی، دارو درمانی و یا ترکیبی از این روش‌ها استفاده کرد. دارو درمانی در بیماران سرطانی شامل شیمی درمانی، بیوتراپی و استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه برخی آنتی‌ژن‌های سلول بدخیم می‌باشد (۶). از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سلول‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد، کمپلکس‌های فلزات سنگین می‌باشند (۷-۹) در دهه‌ی ۱۹۶۰ با مطالعات گسترده‌ای که روی موش‌های آزمایشگاهی صورت گرفت، مشخص گردید که سیس پلاتین دارای خاصیت ضد سرطانی است و ایزومر ترانس آن فاقد این اثر و غیر فعال می‌باشد. به دنبال مطالعات و آزمایش‌های کلینیکی وسیع، سیس پلاتین به عنوان یک داروی ضد سرطان توسط اداره‌ی دارو و غذای آمریکا مورد قبول قرار گرفت. از سال ۱۹۹۹ میلادی یکی دیگر از آنالوگ‌های سیس پلاتین یعنی اگزالی پلاتین به همراه ۵- فلورو اوراسیل یا لکورین برای

درمان سرطان روده‌ی بزرگ در اتحادیه‌ی اروپا استفاده شد.

در حال حاضر نیز از سیس پلاتین به عنوان یک داروی ضد سرطان در درمان بدخیمی‌هایی همچون سرطان بیضه، تخمدان و تومورهای سر و گردن استفاده می‌گردد. در بین داروهای شیمی درمانی مشتق از پلاتینیوم و پالادیوم، بیشتر روی مکانیسم و عملکرد سیس پلاتین مطالعه شده است (۱۰-۱۲). اختلال در همانندسازی DNA، اثر عمده‌ای است که سیس پلاتین در سلول توموری ایجاد می‌کند و همین ایجاد اختلال در همانندسازی DNA است که سبب خاصیت ضد سرطانی سیس پلاتین شده است. توانایی سیس پلاتین در اتصال کووالانسی به DNA و توقف عمل DNA پلیمراز، باعث توقف چرخه‌ی سلولی و مرگ سلولی می‌شود (۱۳-۱۴). به علت وجود اثرات جانبی اکثر داروها و ترکیبات ضد سرطانی از جمله سیس پلاتین مانند آسیب‌های شنوایی، آسیب‌های کلیوی، آسیب‌های دستگاه گوارش و مغز استخوان، همواره تلاش‌های زیادی برای یافتن داروها و کمپلکس‌هایی با قدرت ضد سرطانی بالا و اثرات جانبی کمتر صورت گرفته است.

یکی از راه‌های کاهش اثرات جانبی ترکیبات حاوی فلزات سنگین، استفاده از کمپلکس‌های حاوی لیگاند سولفوردار مانند سیستئین، پنیسیل آمین، میتونین، تیوره، تیوسولفات و به خصوص لیگاند شلاته‌کننده‌ی دی‌اتیل دی‌تیو کاربامات می‌باشد که این لیگاندها باعث کاهش سمیت فلزات سنگین بر کلیه و دیگر بافت‌های بدن می‌شوند. رویکرد دیگر، استفاده از فلزاتی است که خاصیت سمی کمتری بر



شکل ۱. ساختار شیمیایی کمپلکس‌های جدید پالادیوم که n می‌تواند اعداد ۳ (کمپلکس ۱)، ۴ (کمپلکس ۲) و یا ۸ (کمپلکس ۳) باشد.

کمپلکس ۱: μ -۱,۳- پروپیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱,۱- فنانترولین پالادیوم (II)) نیترات
 کمپلکس ۲: μ -۴,۱- بوتیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱,۱- فنانترولین پالادیوم (II)) نیترات
 کمپلکس ۳: μ -۱,۸- اوکتیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱,۱- فنانترولین پالادیوم (II)) نیترات

گروه‌ها

در روش MTT (۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-diphenyltetrazolium bromide -۵,۲-، گروه‌هایی که در ارزیابی کلونی و بررسی مرگ سلولی استفاده شد، به شرح زیر است:

الف) گروه شاهد که تحت تأثیر هیچ گونه دارویی قرار نگرفت.

ب) گروه مورد (Treatment) که در این گروه سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های $0-64 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ برای MTT و $0-8 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ برای ارزیابی تعداد کلونی و ارزیابی نوع مرگ سلولی قرار گرفتند.

ج) گروه مقایسه که در این گروه داروی سیس‌پلاتین در شرایط به‌طور کامل یکسان، با کمپلکس‌های پالادیوم مورد مقایسه قرار گرفت.

کشت سلولی

رده‌ی سلولی KYSY-۳۰ از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI-۱۶۴۰

روی بافت‌های سالم در مقایسه با فلز پلاتین داشته باشند. به همین علت، استفاده از دیگر فلزات گروه پلاتین نظیر پالادیوم، اسمیوم و ایریدیوم در تحقیقات مورد توجه قرار گرفت.

مزیت کمپلکس‌های جدید مورد استفاده در این مطالعه، وجود ریشه‌های دی‌تیو کربامات می‌باشد که بنا به گزارش‌ها، باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می‌شود و همچنین فلز پالادیوم به کار رفته در این کمپلکس‌ها نیز دارای اثرات جانبی کمتری به نسبت فلز پلاتین می‌باشد. وجود ساختار ۱,۱- فنانترولین در ساختمان مولکولی این ۳ کمپلکس پالادیوم، باعث شده است پیوند این مولکول‌ها با DNA از نوع پیوند اینترکالیشن باشد. در پیوند اینترکالیشن یک قسمت مسطحی از مولکول بین بازهای موجود در DNA قرار می‌گیرد و در نتیجه، مانع از رونویسی و همانندسازی DNA می‌شود (۱۵، ۵). از این رو، با توجه به گزارش‌های قبلی مبنی بر حساسیت سرطان‌های دستگاه گوارش به شیمی‌درمانی و کمتر بودن اثرات جانبی کمپلکس‌های پالادیوم حاوی گروه‌های دی‌تیول بر روی سلول‌های کلیه، در این مطالعه برای اولین بار تأثیرات ضد سرطانی این کمپلکس‌ها را روی سلول‌های سرطان مری مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

داروها

کمپلکس‌های پالادیوم زیر در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان مشابه پروتکل گزارش شده ساخته شد (۱۶). ساختار مولکولی این ۳ ترکیب در شکل ۱ نشان داده شده است.

(۱۶۴۰-Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شد و سپس در انکوباتور، در دمای °C ۳۷ و CO₂ ۵ درصد نگهداری شد.

روش MTT

برای انجام MTT ابتدا سلول‌های رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ توسط محلول حاوی تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic- Trypsin) از کف پلیت جدا و با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو و در غلظت 1×10^4 سلول در $200 \mu\text{l}$ در داخل پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس محیط آسپیره گردید. ردیف اول پلیت ۹۶ خانه‌ای به عنوان بلانک، ردیف دوم به عنوان شاهد و ردیف‌های بعدی به ترتیب با غلظت‌های $0/5$ ، 1 ، 2 ، 4 ، 8 ، 16 ، 32 و 64 از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ تیمار گردید.

در این مرحله، از محیط کشت بدون FBS (Fetal bovine serum) استفاده شد و دوباره پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. چهار ساعت قبل از اتمام زمان انکوبه، محیط کشت آسپیره شد و $180 \mu\text{l}$ محیط بدون FBS و $20 \mu\text{l}$ از رنگ MTT (5 mg/ml) به هر ول اضافه گردید و پلیت‌ها برای چهار ساعت دیگر انکوبه و بعد از آن محیط رویی آسپیره شد و $180 \mu\text{l}$ از محلول دی‌متیل سولفوکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) به هر ول اضافه و پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه Shake گردیدند و جذب در 570 nm توسط الیزا ریدر

اندازه‌گیری شد.

در نهایت، میزان بقای سلولی در پلیت ۹۶ خانه‌ای با استفاده از فرمول $100 \times$ (جذب نوری سلول‌های شاهد ÷ جذب نوری سلول‌های مورد) محاسبه و میزان IC₅₀ با برنامه‌ی Sigma plot نسخه‌ی ۱۲ محاسبه گردید (۲۰-۱۷).

روش ارزیابی تعداد کلونی

برای انجام کلونی کانت سلول‌های مربوط به رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ را از ته پلیت توسط تریپسین-EDTA جمع‌آوری و سپس با FBS شستشو داده و در پلیت‌های شش خانه در غلظت ۵۰۰ سلول در هر ول به همراه ۲ cc محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور °C ۳۷ با رطوبت کافی و CO₂ ۵ درصد نگهداری گردید.

سپس سلول‌ها با غلظت‌های $8-0 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ تیمار داده شدند و به مدت هفت روز دیگر انکوبه گردیدند. در طول این هفت روز، هر ۴۸ ساعت محیط‌های کشت آسپیره و دوباره با محیط کشت جدید حاوی دوز مشابه جایگزین می‌شدند. محیط کشت موجود در ول شاهد نیز در طول این هفت روز هر ۴۸ ساعت با محیط کشت جدید جایگزین گردید.

در پایان این هفت روز، محیط کشت آسپیره و سلول‌ها دو بار با محلول PBS شستشو داده شد و کلونی‌های ایجاد شده با متانول ۰/۵ درصد فیکس و با رنگ کریستال ویوله‌ی ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس پلیت‌ها با آب مقطر شستشو و در دمای اتاق خشک گردیدند. در نهایت، از کلونی‌های ایجاد شده در پلیت‌ها، عکس تهیه گردید و توسط نرم‌افزار Image J

Honest significant difference نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها، سطح معنی‌دار آزمون‌ها $0/05 < <$ در نظر گرفته شد. کلونی‌ها با برنامه‌ی ImageJ شمارش شدند و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزارهای Excel و Sigma Plot نسخه‌ی ۱۲ استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان بقای سلولی و مقدار IC_{50}

اثر ۳ کمپلکس جدید ۱، ۲ و ۳ بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ بررسی و میزان بقای سلولی از طریق MTT تعیین گردید. اساس MTT بر مبنای تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول توسط میتوکندری‌های سلول‌های زنده می‌باشد. رسوب حاصل ارغوانی رنگ است. شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلول‌های زنده در هر چاهک با میزان جذب نوری (OD یا Optical density) خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر متناسب می‌باشد.

درصد سلول‌های زنده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه با استفاده از فرمول $100 \times$ (جذب نوری سلول‌های شاهد ÷ جذب نوری سلول‌های مورد) محاسبه گردید. نتایج نشان داد که میزان حیات سلول‌های ۳ رده‌ی سلولی در محدوده‌ی غلظت‌های $0/125-64 \mu\text{g/ml}$ کمپلکس‌های جدید پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، روند کاهشی از خود نشان می‌دهند که این روند کاهشی، متناسب با دوز کمپلکس‌ها می‌باشد؛ به طوری که در دوزهای بالا، میزان حیات سلولی، کاهش زیادی را در مقایسه با

کلونی‌ها شمارش شدند و IC_{50} محاسبه گردید (۲۱).

رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید

رده‌ی سلولی سرطان مری (KYSE-۳۰)، در پلیت فلاسک T۲۵ کشت داده شدند. بعد از گذشت یک هفته، با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، تعداد ۱۲۰۰۰ سلول در هر پلیت شش خانه به مدت هفت روز کشت داده شدند. روز اول محیط کشت سلول‌ها با دوزهای مختلف از ۳ نوع کمپلکس پالادیومی تعویض شد. بعد از هفت روز، سلول‌ها با مخلوط رنگ آکریدین اورنج ($100 \mu\text{g/ml}$) و اتیدیوم بروماید ($100 \mu\text{g/ml}$) رنگ‌آمیزی شدند و بعد از ۵ دقیقه با میکروسکوپ فلورسنت مدل المپیوس، تصاویری تهیه گردید.

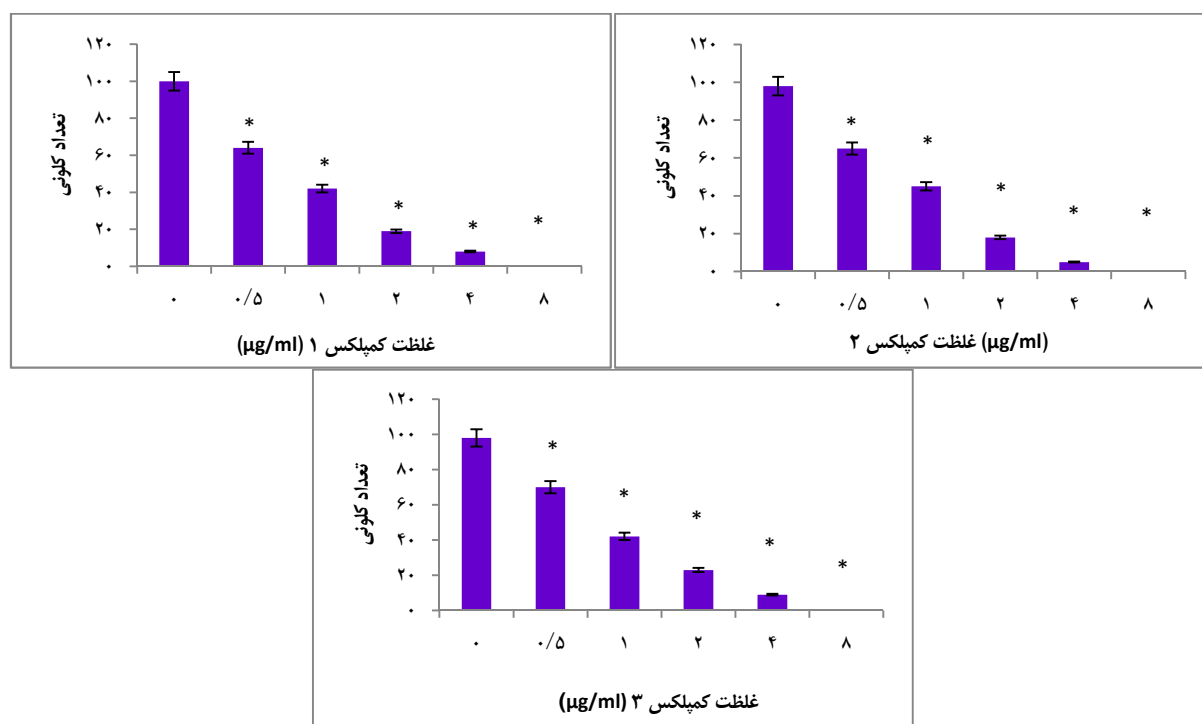
هسته‌ی سلول‌های آپوتوتیک متراکم و قطعه قطعه شده و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل تمایز بودند، علاوه بر آن در این روش، سلول‌های آپوتوتیک اولیه با هسته‌ی متراکم سبز کم‌رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم، از سلول‌های آپوتوتیک تأخیری با هسته‌ی متراکم قرمز و قطعه قطعه قابل تفکیک بودند. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص بودند و سلول‌های سالم نیز به رنگ سبز پررنگ دیده می‌شدند (۱۷-۱۸).

آنالیز آماری

در تمامی مراحل، هر آزمون ۳ بار تکرار شد و داده‌های به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) یا (One-way analysis of variance) و آزمون Tukey (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD یا

جدول ۱. مقدار IC_{50} به دست آمده از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ و داروی سیس پلاتین بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ با روش MTT ($2,5\text{-diphenyltetrazolium bromide}$ - 2-yl - $4,5\text{-Dimethylthiazol}$) (۳- (۲۴ و ۴۸ ساعته) و کلونی کانت. مقادیر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ می‌باشند

کلونی کانت	MTT (۴۸ ساعت)	MTT (۲۴ ساعت)	کل IC_{50}
کمپلکس ۱	0.89 ± 0.25	0.87 ± 0.11	0.86 ± 0.20
کمپلکس ۲	0.95 ± 0.31	1.02 ± 0.20	0.94 ± 0.24
کمپلکس ۳	1.06 ± 0.22	1.05 ± 0.23	1.07 ± 0.17
سیس پلاتین	2.00 ± 0.46	1.79 ± 0.30	2.26 ± 0.41

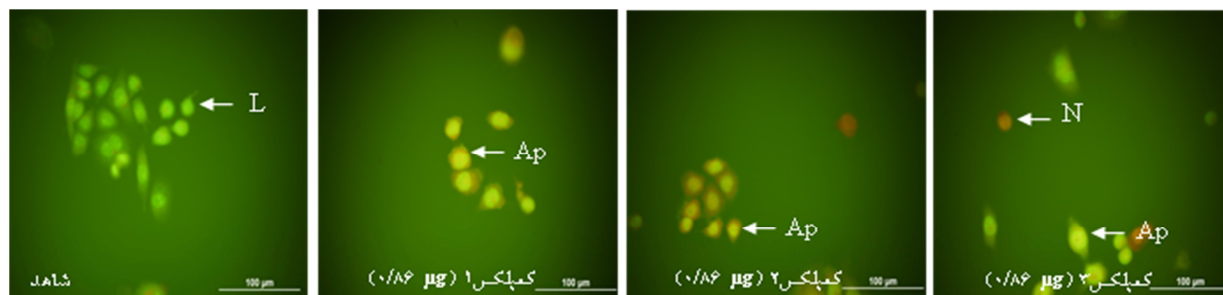


شکل ۳. این نمودار تأثیر رقت‌های مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ بر روی تعداد کلونی‌های رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ را نشان می‌دهد ($P < 0.001$)

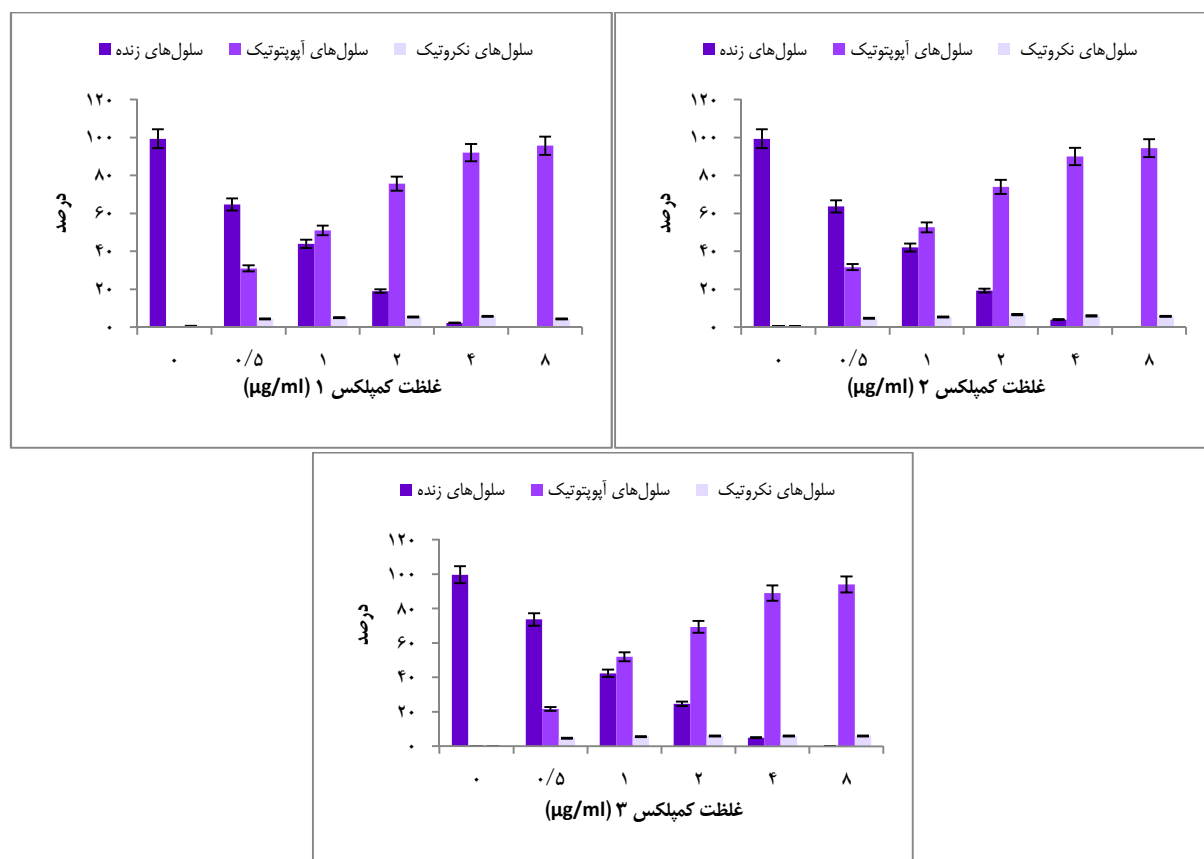
بررسی مرگ سلولی

برای بررسی نوع مرگ سلولی ناشی از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم برمایند استفاده گردید. بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌های تیمار شده با کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳، سلول‌هایی با هسته‌ای زرد رنگ و دارای تغییرات مورفولوژیک از جمله تراکم و قطعه قطعه شدن هسته که دارای اجسام آپوتوتیک بودند،

مشاهده گردید. هسته‌ی سلول‌های نکروتیک نیز با رنگ قرمز از دیگر سلول‌ها قابل تفکیک بود (شکل ۴). بعد از این رنگ‌آمیزی، تعداد سلول‌های زنده و آپوتوتیک و نکروتیک مورد شمارش قرار گرفت. نتایج، گویای افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های آپوتوتیک بود؛ به طوری که با افزایش غلظت این کمپلکس‌ها بر تعداد سلول‌های آپوتوتیک افزوده و از تعداد سلول‌های زنده کاسته شد (شکل ۵).



شکل ۴. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید رده‌ی سلولی KYSE-30 تیمار شده با دوز IC₅₀ کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳: سلول‌های زنده، Ap: سلول‌های آپپتوتیک، N: سلول‌های نکروتیک. مقادیر بر حسب μg/ml می‌باشد



شکل ۵. مقایسه‌ی درصد سلول‌های زنده، آپپتوتیک و نکروتیک در رده‌ی سلولی KYSE-30 تیمار شده با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳

کرد (۲-۴). مطالعات دکتر ترشیزی و همکاران نشان داد که کمپلکس‌های ۲ و ۲'-بای پیریدین بوتیل دی تیو کربامات پلاتینیوم (II) و پالادیوم (II) با DNA واکنش می‌دهند و در غلظت پایین (100 μmol) باعث دناتوره شدن DNA سلول‌های رده‌ی سلولی

بحث

از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سلول‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان به کمپلکس‌های حاوی فلزات سنگین نظیر پلاتین، پالادیوم، اسمیوم و ایریدیوم (Iridium) اشاره

کمپلکس دیگر و مقدار IC_{50} برای کمپلکس ۱ برابر $0.20 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. با توجه به این که این کمپلکس در اندازه‌ی مولکولی با هم اختلاف دارند و کمپلکس ۱ کشیدگی مولکولی کمتری در مقایسه با ۳ کمپلکس دیگر دارد؛ این احتمال وجود دارد که اندازه‌ی مولکول نیز در اتصال کارآمد به DNA و سایتو توکسیسیتة نقش داشته باشد.

در مطالعه‌ی مشابهی، منصوری ترشیزی و همکاران تأثیر دو کمپلکس جدید پلاتینیوم و پالادیوم را روی رده‌ی سلولی K562 بررسی و آن را با سیس پلاتین مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که این دو ترکیب، اثرات ضد سرطانی بیشتری نسبت به سیس پلاتین دارند. سلول‌های این رده، حساسیت متفاوتی را در مقابل این دو کمپلکس ستنز شده نشان دادند (۲۲).

در مطالعه‌ای که توسط آریان‌پور و همکاران انجام شد، ۳ کمپلکس پالادیوم جدید روی ۳ لاین سلولی کبد، ریه و تخمدان مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه با سیس پلاتین مقایسه گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که رده‌ی سلولی A549 بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(Bu-dtc)]Cl$ و رده‌ی سلولی سرطان کبد (HepG2) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(hex-dtc)]Cl$ از خود نشان داد. همچنین رده‌ی سلولی سرطان تخمدان (OV2008) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(Bu-dtc)]$ از خود نشان داد (۷).

همچنین مطالعه‌ی دیوسالار و همکاران، نشان داد که مقدار IC_{50} به دست آمده از اثر کمپلکس $2,2'$ -bipyridin ButylglycinatoPt (II) nitrate بر روی لاین سلولی K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه بیشتر از $100 \mu\text{mol}$ می‌باشد (۲۳).

K562 می‌شود (۲۲). با این حال، استفاده از این داروها، محدودیت‌های قابل توجهی دارد؛ به لحاظ این که به بسیاری از بافت‌های سالم بدن آسیب می‌زند. این محدودیت‌ها باعث شده است تلاش‌هایی جهت ساخت داروهایی بر پایه‌ی پلاتین یا پالادیوم انجام شود که نسبت به سلول‌های طبیعی، دارای سمیت کم و نسبت به سلول‌های سرطانی، قدرت تخریبی بالا داشته باشند.

یکی از استراتژی‌های کاهش اثرات جانبی ترکیبات حاوی فلزات سنگین، استفاده از کمپلکس‌های حاوی لیگاند شلاته کننده‌ی دی‌اتیل دی‌تیو کربامات می‌باشد که این لیگاندها باعث کاهش اثرات سمی فلزات سنگین بر سلول‌های کلیه و دیگر بافت‌های بدن می‌شوند (۷). مزیت کمپلکس‌های جدید مورد استفاده در این مطالعه، وجود ریشه‌های دی‌تیو کربامات است که بنا به گزارش ها، باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می‌شود و همچنین فلز پالادیوم به کار رفته در این کمپلکس‌ها نیز دارای اثرات جانبی کمتری به نسبت فلز پلاتین می‌باشد. در این مطالعه، کمپلکس‌های پالادیوم طبق روش مشابهی که رفرنس داده شده است، در آزمایشگاه ساخته شد (۱۶).

داده‌های به دست آمده از میزان IC_{50} این کمپلکس‌ها نشان داد که کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ دارای اثرات بالقوه سمی بر روی رده‌ی سلولی KYSE-30 هستند و میزان IC_{50} به دست آمده از اثر این ۳ کمپلکس جدید بر روی رده‌ی سلولی، از میزان IC_{50} به دست آمده از اثر سیس پلاتین بر روی این رده‌ی سلولی پایین‌تر می‌باشد. همچنین اثر کمپلکس ۱ بر روی این رده‌ی سلولی، بهتر از دو

آپوپتوتیک افزوده و از تعداد سلول‌های زنده کاسته شد. نکروز و آپوپتوز دو روش مجزای مرگ سلولی می‌باشند. آپوپتوز همانند تمایز و تکثیر سلولی یکی از روش‌های مهم کنترل سلولی محسوب می‌گردد و هر گونه اختلال در آن، منجر به رشد غیر طبیعی سلول‌ها می‌شود (۲۶).

آپوپتوز به عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول نیز خوانده می‌شود (۲۶-۲۷). بر خلاف آپوپتوز، نکروز مرگ پاتولوژیک سلول است که در طی آسیب‌های شدید به سلول رخ می‌دهد (۲۸-۲۹). در این مطالعه، کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ توانایی بالایی در توقف چرخه‌ی سلولی و القای آپوپتوز از خود نشان دادند. از آن جا که آپوپتوز یک مکانیسم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن است و با توجه به این که اختلال در این فرایند به عنوان یک عامل مهم در ایجاد و گسترش سرطان به شمار می‌آید، اثر کمپلکس‌های جدید پالادیوم در القای آپوپتوز می‌تواند حایز اهمیت باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Kontek و همکاران انجام شد، آن‌ها نشان دادند که کمپلکس جدید سنتز شده‌ی پالادیوم با فرمول عمومی $[PdCl_2(2-pmOpe)_2]$ - trans دارای phosphates $diethyl(pyridine-2-ylmethyl)$ در ساختمان خود می‌باشد اثرات سایتوتوکسیک بالایی در برابر رده‌های سلولی سرطانی $(IC_{50} = 103/8 \mu M)$ و $A549 (IC_{50} = 150 \mu M)$ در مقایسه با لئوسیت‌های طبیعی خون انسان $(IC_{50} = 242/5 \mu M)$ از خود نشان می‌دهند. در تمام رده‌های سلولی این کمپلکس قادر به القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌ها می‌باشد (۳۰).

در مطالعه‌ی Tayyem و همکاران اثر ضد سرطانی چهار کمپلکس جدید فلزی متشکل از پلاتین و پالادیوم با فرمول عمومی $trans-PtCl(NH_3)_2\}2\mu\{-trans-Pd(NH_3)_2-(H_2N(CH_2)_nNH_2)_2\}Cl_4$ (که در آن $n = 4-7$ می‌باشد) را بر روی سرطان‌های تخمدان (A_{2780} , $cisR$, A_{2780} و $ZD0473$ ، A_{2780})، ملانوما ($Me-10538$) و ریه ($NCIH460$) بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این ۴ کمپلکس جدید، بیشترین اثر را در مقابل سرطان تخمدان دارند و در بین این ۴ کمپلکس، اثر کمپلکس $trans-PtCl(NH_3)_2\}2\mu\{-trans-Pd(NH_3)_2-(H_2N(CH_2)_6NH_2)_2\}Cl_4$ از بقیه بهتر می‌باشد. مقدار IC_{50} برای این کمپلکس در رده‌های سلولی A_{2780} , $cisR$, A_{2780} و $ZD0473$ به ترتیب برابر $0/048 \mu mol$ ، $0/250$ و $0/230$ می‌باشد (۲۴).

در مطالعه‌ی Gao و همکاران مشاهده شد که کمپلکس فلزی سنتز شده با فرمول H_2O $[Pd(bpy)(bmal)]$ که در آن bpy -bipyridyl $= 2,2'$ و $bmal = benzylmalonate$ می‌باشد، اثرات سایتوتوکسیک در برابر رده‌ی سلولی سرطان ریه ($AGZY-83$) از خود نشان می‌دهد ($IC_{50} = 55/4 \mu g/ml$) (۲۵).

برای بررسی نوع مرگ سلولی ناشی از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ بر روی این ۳ رده‌ی سلولی، از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم برماید استفاده گردید که نتایج نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های آپوپتوتیک می‌باشد؛ به طوری که با افزایش غلظت این کمپلکس‌ها، بر تعداد سلول‌های

سرطانی مری در شرایط *In vitro* از خود نشان می‌دهند و این کمپلکس‌ها می‌توانند بعد از مطالعات *In vivo* و همچنین انجام تحقیقات تکمیلی، به عنوان جایگزین مناسبی برای درمان سرطان معده، کبد و مری محسوب شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی و مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و مدیریت محترم گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نمایند. مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی ثبت شده در شورای پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی اردبیل می‌باشد.

غلظت بالای یون کلرید در دستگاه گوارش، موجب غیر فعال شدن سیس پلاتین و کاهش اثرات ضد سرطانی آن می‌شود، اما به خاطر این که این ۳ کمپلکس جدید با یون کلرید موجود در دستگاه گوارش واکنش نمی‌دهند و غیر فعال نمی‌شوند، می‌توانند کاندیدای بهتری برای درمان تومورهای موجود در این نواحی باشند. همچنین انتظار می‌رود این کمپلکس‌های جدید در مقایسه با سیس پلاتین، اثرات سمی کمی بر روی سلول‌های کلیه داشته باشند؛ چرا که آن‌ها با گروه‌های سولفیدریل سلول‌های توبول‌های کلیه واکنش نشان نمی‌دهند (۳۱).

در پایان می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کمپلکس‌های جدید پالادیوم، تأثیرات بیشتری در مقایسه با سیس پلاتین روی مرگ سلولی سلول‌های

References

1. Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, van Cutsem E. Principles and practice of gastrointestinal oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
2. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(23): 2241-52.
3. Zhao JS, Li WJ, Ge D, Zhang PJ, Li JJ, Lu CL, et al. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One* 2011; 6(6): e21419.
4. Yang PC, Davis S. Incidence of cancer of the esophagus in the US by histologic type. *Cancer* 1988; 61(3): 612-7.
5. Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, et al. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9582-7.
6. Foltinova V, Svihalkova Sindlerova L, Horvath V, Sova P, Hofmanova J, Janisch R, et al. Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12, new Pt (IV)-based drugs. A minireview. *Scripta Medica (BRNO)* 2008; 81(2): 105-16.
7. Aryanpour N, Mansouri-Torshizi H, Nakhjavan M, Shirazi H. Cytotoxicity of Diimine Palladium (II) Complexes of Alkyldithiocarbamate Derivatives on Human Lung, Ovary and Liver Cells. *Iran J Pharm Res* 2012; 11(2): 689-95.
8. Balcerzak M. Sample digestion methods for the determination of traces of precious metals by spectrometric techniques. *Anal Sci* 2002; 18(7): 737-50.
9. Tusek-Bozic L, Juribasic M, Traldi P, Scarzia V, Furlani A. Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of monoethyl 8-quinolylmethylphosphonate. *Polyhedron* 2008; 27(4): 1317-28.
10. Barnes KR, Kutikov A, Lippard SJ. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a series of estrogen-tethered platinum(IV) complexes. *Chem Biol* 2004; 11(4): 557-64.
11. Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6559-65.
12. Rajabi N, Nematbakhsh M, Pezeshki Z, Talebi A, Ashrafi F. N-Acetylcysteine and Cisplatin-Induced Nephrotoxicity: Is It a Suitable Antioxidant Supplementation to Prevent

- Nephrotoxicity in Male or Female Rats? *J Isfahan Med Sch* 2013; 31(229): 294-304. [In Persian].
13. Zamble DB, Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(10): 435-9.
 14. Sullivan EJ, Kurtoglu M, Brennen R, Liu H, Lampidis TJ. Targeting cisplatin-resistant human tumor cells with metabolic inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73(2): 417-27.
 15. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7(1): 3-18.
 16. Mansouri-Torshizi H, Saeidifar M, Divsalar A, Saboury AA. Interaction studies between a 1,10-phenanthroline adduct of palladium(II) dithiocarbamate anti-tumor complex and calf thymus DNA. A synthesis spectral and in-vitro study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2010; 77(1): 312-8.
 17. Jafari N, Bohlooli S, Mohammadi S, Mazani M. Cytotoxicity of methylsulfonylmethane on gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. *J Gastrointest Cancer* 2012; 43(3): 420-5.
 18. Bohlooli S, Jafari N, Jahed S. Cytotoxic effect of freeze-dried extract of Ecballium elaterium fruit on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *J Gastrointest Cancer* 2012; 43(4): 579-83.
 19. Mansouri-Torshizi H, Saeidifar M, Khosravi F, Divsalar A, Saboury AA, Hassani F. DNA Binding and Antitumor Activity of alpha-Diimineplatinum(II) and Palladium(II) Dithiocarbamate Complexes. *Bioinorg Chem Appl* 2011; 2011: 394506.
 20. Sharma C, Vas AJ, Goala P, Gheewala TM, Rizvi TA, Hussain A. Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract Prevents Growth of MCF-7 and HeLa Cells and Potentiates the Therapeutic Index of Cisplatin. *J Oncol* 2014; 2014: 321754.
 21. Jha HC, Lu J, Saha A, Cai Q, Banerjee S, Prasad MA, et al. EBNA3C-mediated regulation of aurora kinase B contributes to Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation through modulation of the activities of the retinoblastoma protein and apoptotic caspases. *J Virol* 2013; 87(22): 12121-38.
 22. Mansouri-Torshizi H, Moghaddam M, Divsalar A, Saboury AA. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(21): 9616-25.
 23. Divsalar A, Saboury AA, Ahadi L, Zemanatiyar E, Mansouri-Torshizi H. Investigation of effects of newly synthesized Pt(II) complex against human serum albumin and leukemia cell line of K562. *BMB Rep* 2010; 43(11): 766-71.
 24. Tayyem H, Huq F, Yu JQ, Beale P, Fisher K. Synthesis and activity of a trinuclear platinum complex: $[\{trans-PtCl(NH_3)_2\}2\mu-\{trans-Pt(3-hydroxypyridine)_2(H_2N(CH_2)_6NH_2)_2\}]Cl_4$ in ovarian cancer cell lines. *ChemMedChem* 2008; 3(1): 145-51.
 25. Gao EJ, Wang KH, Gu XF, Yu Y, Sun YG, Zhang WZ, et al. A novel binuclear palladium complex with benzothiazole-2-thiolate: synthesis, crystal structure and interaction with DNA. *J Inorg Biochem* 2007; 101(10): 1404-9.
 26. Macdonald F, Ford C, Casson A. *Molecular biology of cancer* Florence, Kentucky: Taylor and Francis; 2004.
 27. Neves I, Jr., Bertho AL, Veloso VG, Nascimento DV, Campos-Mello DL, Morgado MG. Improvement of the lymphoproliferative immune response and apoptosis inhibition upon in vitro treatment with zinc of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV+ individuals. *Clin Exp Immunol* 1998; 111(2): 264-8.
 28. Armitage D, Wilkinson G, Stone F, Abel E. *Comprehensive organometallic chemistry*. New York, NY: Pergamon Press; 1982. vol 2. p.99.
 29. Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* 1991; 201: 477-82.
 30. Kontek R, Matlawska-Wasowska K, Kalinowska-Lis U, Kontek B, Ochocki J. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells in vitro. *Acta Pol Pharm* 2011; 68(1): 127-36.
 31. Zhao G, Sun H, Lin H, Zhu S, Su X, Chen Y. Palladium(II) complexes with N,N'-dialkyl-1,10-phenanthroline-2,9-dimethanamine: synthesis, characterization and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem* 1998; 72(3-4): 173-7.

Anticancer Effects of Palladium Complexes of Dithiocarbamate Derivatives on Esophageal Cancer Cell Line (KEYSE-30)

Nowruz Najafzadeh PhD¹, Sharam Hadizadeh PhD², Mohammad Mazani PhD³,
Mojtaba Amani PhD⁴, Hassan Mansouri-Torshizi PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Surgery, radiation therapy, drug therapy or a combination of these methods can be used for the treatment of malignancies. Drug therapy in cancer includes chemotherapy, biotherapy and use of monoclonal antibodies against antigens of malignant cells. Heavy metal complexes are of the compounds used as drugs in chemotherapy against malignant cells. The present study aimed to assess the effects of new anticancer palladium complexes on esophageal cancer cells.

Methods: New palladium complexes, namely [(phen) Pd (μ -al-bis-dtc) Pd (phen)] (NO₃)₂ (where alkylenebisdithiocarbamate, al-bis-dtc = propylenebisdithiocarbamate (pn-bis-dtc, 1); butylenebisdithiocarbamate (bu-bis-dtc, 2); octylenebis- dithiocarbamate (oc-bis-dtc, 3) and phen=1,10-phenanthroline) was synthesized in the laboratory of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, Iran. To investigate the anticancer effects of three new complexes compared to cisplatin on esophageal cancer cell line (KYSE-30), cytotoxicity was examined through MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and clonogenic assays. Ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining was used for apoptotic and necrotic cells detection.

Findings: The results of MTT and clonogenic assays showed that the IC₅₀ value obtained from cells treated with complexes 1, 2 and 3 were much lower than cisplatin and also ethidium bromide/acridine orange staining demonstrated that three new complexes applied its cytotoxic effect via apoptotic pathway. Comparing the number of colonies formed after treatment with various concentrations of palladium complexes showed significant differences compared with control (P < 0.001).

Conclusion: Findings of this study showed that anti-tumor effect of three new complexes on KYSE-30 cell line were higher than that of cisplatin. And, even the use of low concentrations of palladium complexes can reduce the number of colonies and induce cell death by apoptosis. With further researches later, it can be used as an alternative drug in the treatment of esophageal cancer.

Keywords: KEYSE-30, New palladium complexes, Colony assay, Apoptosis, Necrosis

Citation: Najafzadeh N, Hadizadeh Sh, Mohammad Mazani M, Amani M, Mansouri-Torshizi H. Anticancer Effects of Palladium Complexes of Dithiocarbamate Derivatives on Esophageal Cancer Cell Line (KEYSE-30). J Isfahan Med Sch 2014; 32(294): 1129-41

1- Assistant Professor, Department of Anatomy and Pathology, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2- MSc Student, Department of Biochemistry, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4- Associate Professor, Department of Biophysics, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

5- Assistant Professor, Department of Chemistry, School of Basic Sciences, University of Sistan and Balochestan, Zahedan, Iran

Corresponding Author: Sharam Hadizadeh PhD Email: shahramhadizadeh@yahoo.com