

The effect of new palladium (II) complexes of dithiocarbamate derivatives on the morphology and clonogenicity of liver cancer cell line

Hadizadeh Sh¹, Mazani M^{1*}, Najafzadeh N², Mansouri-Torshizi H³, Pourheydar B⁴, Mirzanejad-Asl H⁵

1- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I. R. Iran.

2- Department of Anatomy and Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I. R. Iran.

3- Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Sistan and Baluchistan, Zahedan, I. R. Iran.

4- Department of Anatomy and Pathology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, I. R. Iran.

5- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I. R. Iran.

Received April 8, 2014; Accepted October 29, 2014

Abstract:

Background: While today different drugs have been used to treat cancer, none of them have proved to be effective. Heavy metal complexes (e.g., platinum and palladium) can be useful in the treatment of cancer. The purpose of this study was to evaluate the effects of newly synthesized palladium complexes on the morphology and clonogenicity of liver cancer cell line (HepG2).

Materials and Methods: New palladium complexes were synthesized in the chemistry lab, University of Sistan and Baluchesta. The cytotoxicity and anti-cancer effects of newly synthesized complexes were evaluated using the clonogenic and cell death assay (apoptosis and necrosis) using acridine orange/ ethidium bromide double staining.

Results: The results of this study showed that the new complexes had potential concentration-dependent effects on HepG2 cell line. There was a significant difference between the number of colonies formed after treatment with different concentrations of palladium complexes (0.5, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$) compared to those in the control group ($P < 0.01$). Furthermore, the cells stained with acridine orange/ethidium bromide indicated the occurrence of apoptosis in cancer cells after the treatment with various concentrations of palladium complexes.

Conclusion: The results of this study show the anti-cancer effect of palladium complexes on HepG2 cell lines. Also, the palladium complexes can reduce the number of cell colonies and cause cell death by apoptosis.

Keywords: HepG2, DNA, Apoptosis, Necrosis

* **Corresponding Author.**

Email: m.mazani@arums.ac.ir

Tel: 0098 914 454 7394

Fax: 0098 453 351 3776

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2015; Vol. 18, No 6, Pages 506-514

Please cite this article as: Hadizadeh Sh, Mazani M, Najafzadeh N, Mansouri-Torshizi H, Pourheydar B, Mirzanejad-Asl H. The effect of new palladium (II) complexes of dithiocarbamate derivatives on the morphology and clonogenicity of liver cancer cell line. *Feyz* 2014; 18(6): 506-14.

اثر کمپلکس‌های جدید پالادیوم دی‌تیوکارباماتی بر مورفولوژی و کلونی‌زایی سلول‌های سرطان کبد

شهرام هادی زاده^۱، محمد مازنی^{۲*}، نوروز نجف زاده^۳، حسن منصوری ترشیزی^۴، باقر پورحیدر^۵، حافظ میرزائزاد اصل^۶

خلاصه:

سابقه و هدف: تاکنون داروهای متفاوتی برای درمان سرطان‌ها ارائه شده است، اما هیچ‌یک باعث درمان کامل سرطان نشده است. کمپلکس‌های فلزات سنگین مانند پلاتین و پالادیوم می‌توانند در درمان برخی سرطان‌ها مفید باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات کمپلکس‌های جدید پالادیوم بر مورفولوژی و کلونی‌زایی رده سلولی سرطان کبد انجام شده است.

مواد و روش‌ها: کمپلکس‌های جدید پالادیوم در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان سنتز شد و به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی آن روی رده سلول سرطانی کبد از روش‌های ارزیابی کلونی و بررسی مرگ سلولی (آپوپتوز و نکروز) توسط رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

نتایج: بررسی نتایج نشان داد که کمپلکس‌های جدید تاثیر بالقوه‌ای به‌صورت وابسته به غلظت بر رده سلولی سرطان کبد دارد. تعداد کلونی‌های شکل گرفته بعد از تیمار با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمپلکس‌های پالادیوم، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با کنترل نشان داد ($P < 0/01$). همچنین، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز پس از تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف سه کمپلکس پالادیوم بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده از کمپلکس‌های پالادیوم تاثیر ضد سرطانی بالایی در برابر رده سلولی سرطان کبد داشته و می‌تواند تعداد کلونی سلولی را کاهش دهد و باعث آپوپتوز شود.

واژگان کلیدی: رده سلولی HepG2، DNA، آپوپتوز، نکروز

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳، صفحات ۵۱۴-۵۰۶

مقدمه

HCC می‌تواند الگوی رشد متفاوتی داشته باشد؛ گاهی به‌صورت یک تومور منفرد رشد کرده و در اواخر بیماری به بخش‌های دیگر کبد پخش می‌شود و در بعضی مواقع هم یک تومور واحد نمی‌باشد، بلکه به صورت تعداد زیادی لکه (Spots) در سراسر کبد ایجاد می‌شود. این نوع از سرطان بیشتر در افراد مبتلا به آسیب‌های پایدار کبد (سیروز) به‌وجود می‌آید [۳-۷]. مطالعات انجام شده توسط Rosenberg و همکارانش نشان داد که کمپلکس‌های فلزی دارای پلاتین (II) و پلاتین (IV) هر دو خاصیت ضد سرطانی از خود نشان می‌دهند [۸]. به‌دنبال مطالعات و آزمایشات کلینیکی وسیع، سیس پلاتین به‌عنوان یک داروی ضد سرطان توسط اداره دارو و غذای آمریکا مورد قبول قرار گرفت [۹]. در حال حاضر نیز از سیس پلاتین به‌عنوان یک داروی ضد سرطان در درمان سرطان‌های بیضه، تخمدان، مثانه، سرویکس، سر و گردن، و مری استفاده می‌شود [۱۴-۱۰]. مکانیسم بیوشیمیایی ضد سرطانی سیس پلاتین مربوط به اتصال این دارو با DNA از طریق پیوند کووالانسی با اتم N7 حلقه امیدازول موجود در باز گوانوزین یا آدنوزین می‌باشد [۱۷-۱۵]. این اتصال به‌صورت‌های پیوند بین رشته‌ای، پیوند داخل رشته‌ای و پیوند بین مولکولی می‌باشد [۱۸]. همچنین، سیس پلاتین علاوه بر DNA با بسیاری از ترکیبات داخل سلولی نظیر گلوکاتینون، سیستئین، میتوین و دیگر

هیپاتوسلولار کارسینوما (HCC) از شایع‌ترین سرطان‌های اولیه کبد است و سومین سرطان منجر به مرگ در دنیا می‌باشد [۱]. این سرطان هفتمین سرطان شایع در مردان و نهمین سرطان در زنان می‌باشد [۲]. این سرطان از هیپاتوسیت‌ها که از سلول‌های اصلی کبد می‌باشند، منشا می‌گیرد. از عوامل اصلی در ایجاد HCC می‌توان به سیروز کبدی و هیپاتیت ویروسی (هیپاتیت B و C) اشاره کرد [۱]. از هر چهار مورد سرطانی که از کبد منشا می‌گیرد سه مورد مربوط به این نوع سرطان می‌باشد.

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

^۲ دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

^۳ استادیار، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

^۴ استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان

^۵ استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۶ استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

* نشانی نویسنده مسئول:

اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

تلفن: ۰۹۱۴ ۴۵۴۷۳۹۴

دورنویس: ۰۴۵۳۳۵۱۳۷۷۶

پست الکترونیک: m.mazani@arums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۸/۷

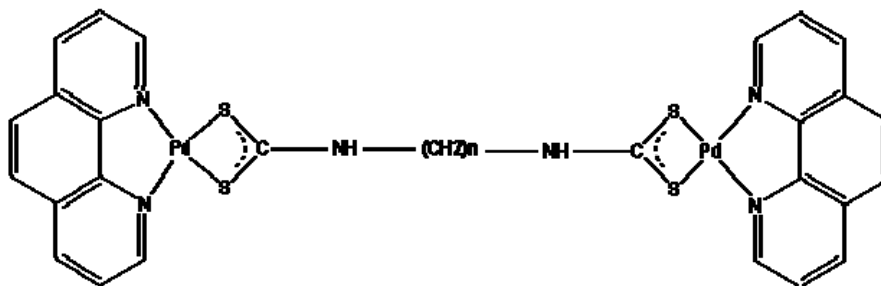
تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۹

فنانترولین که در ساختمان این سه کمپلکس جدید حضور دارد، این سه کمپلکس می‌توانند از طریق پیوند اینترکالیشن با DNA اتصال برقرار کنند. این کمپلکس‌های جدید در مقایسه با سیس پلاتین انتظار می‌رود که اثرات سمی کمی بر روی سلول‌های کلیوی داشته باشند؛ زیرا آنها با گروه‌های سولفیدریل سلول‌های توبول‌های کلیه واکنش نشان نمی‌دهند [۲۸]. لذا، با توجه به گزارشاتی که بیان‌گر پایین بودن اثرات سمی کمپلکس‌های پالادیوم حاوی گروه‌های دی‌تیول بر روی سلول‌های کلیه بوده و همچنین بالا بودن میزان بروز و مرگ و میر ناشی از سرطان کبد بر آن شدیم که اثر این سه کمپلکس را بر رده سلولی مربوط به سرطان کبد مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

داروها

کمپلکس‌های پالادیوم ذیل در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان مشابه پروتکل گزارش شده توسط منصوره ترشیزی و همکاران ساخته شد [۲۹].
کمپلکس ۱: $\mu\text{-}1,3$ - پروپیلن بیس (دی تیوکربامات) بیس (۱,۰,۱)-
فنانترولین پالادیوم (II) نیترات: کمپلکس ۲: $\mu\text{-}4,1$ - بوتیلن بیس (دی تیوکربامات) بیس (۱,۰,۱)- فنانترولین پالادیوم (II) نیترات؛ و
کمپلکس ۳: $\mu\text{-}1,8$ - اوکتیلن بیس (دی تیوکربامات) بیس (۱,۰,۱)-
فنانترولین پالادیوم (II) نیترات. ساختار مولکولی این سه ترکیب در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



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

پالادیوم برای ارزیابی کلونی و رنگ آمیزی آکریدین اورنج و ایدیوم بروماید قرار گرفتند.

کشت سلولی

رده سلولی (Human Liver Hepato- HepG2 cellular Carcinoma cell line) از شرکت انستیتو پاستور

بیومولکول‌های حاوی اتم S می‌تواند پیوند برقرار کند که باعث غیر فعال شدن آن می‌گردند [۲۰، ۱۹]. از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت در سلول‌های سرطانی نسبت به سیس پلاتین می‌توان به غیرفعال شدن آن در داخل سلول توسط مولکول‌های تیول‌دار، وجود مکانیسم‌هایی برای خارج کردن آن از سلول، افزایش مکانیسم‌های ترمیمی DNA و ایجاد تحمل نسبت به آن اشاره کرد [۲۲، ۲۱، ۱۱]. به‌علت وجود اثرات جانبی سیس پلاتین مانند توکسیسیته، اتوتوکسیسیته، نفروتوکسیسیته، آسیب‌های دستگاه گوارش و آسیب‌های مغز استخوان، همواره تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن داروها و کمپلکس‌هایی با قدرت ضد سرطانی بالا و اثرات جانبی کمتر صورت گرفته است [۲۳-۲۵]. یکی از استراتژی‌های کاهش اثرات جانبی ترکیبات حاوی فلزات سنگین، استفاده از فلزاتی است که خاصیت سمی کمتری نسبت به پلاتین دارند؛ به همین علت استفاده از دیگر فلزات گروه پلاتین نظیر پالادیوم، روتنیوم، رودیم، اسمیوم و ایریدیوم در تحقیقات مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. رویکرد دیگر استفاده از کمپلکس‌های حاوی لیگاند سولفوردار مانند سیستین، پنسیل آمین، میتونین، تیوره، تیوسولفات و به‌خصوص لیگاند شلاته کننده دی اتیل دی تیوکربامات (DDTC) می‌باشد که این لیگاندها باعث کاهش سمیت فلزات سنگین بر کلیه و دیگر بافت‌های بدن می‌شوند [۲۶، ۱۰] و این به‌علت خاصیت عناصر S و N می‌باشد که باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می‌گردد [۲۷، ۱۰]. کمپلکس‌های مورد مطالعه در این تحقیق با مکانیسم متفاوت از سیس پلاتین با DNA پیوند برقرار می‌کنند. به‌علت ساختمان مسطح ۱ و ۱۰

گروه‌ها

گروه‌هایی که در ارزیابی کلونی و بررسی مرگ سلولی استفاده شد به شرح ذیل است: الف) گروه کنترل که به مدت هفت روز تحت تاثیر هیچ‌گونه دارویی قرار نمی‌گرفت؛ و ب) گروه تیمار که در این گروه سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های صفر تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۵/۰، ۱، ۲، ۴، ۸) از کمپلکس‌های جدید

آنالیز آماری

در تمامی مراحل، هر آزمون سه بار تکرار شده و داده‌های به‌دست آمده به‌صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شدند. کلونی‌ها و هم‌چنین سلول‌های رنگ آمیزی شده با آکریدین اورنج و اتدیوم بروماید با برنامه ImageJ شمارش شدند و برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به‌دست آمده از شمارش کلونی، از نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

ارزیابی تعداد کلونی‌ها

ارزیابی کلونی‌ها با رنگ آمیزی کریستال ویوله نشان داد که تعداد کلونی‌های با بیش از ۵۰ سلول با افزایش غلظت دارو در هر سه کمپلکس پالادیوم کاهش یافته؛ به‌طوری‌که در سلول‌های تیمار شده با کمپلکس یک، تعداد کلونی‌ها در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافته تا اینکه در غلظت‌های ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صفر می‌رسد (نمودار شماره ۱) و در کمپلکس ۲ نیز تعداد کلونی‌ها بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف روند کاهشی از خود نشان می‌دهد تا اینکه در غلظت ۸ میکروگرم به صفر می‌رسد. در کمپلکس ۳ نیز روند کاهشی تعداد کلونی‌های تیمار شده از غلظت ۰/۵ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده می‌شود و کمترین تعداد کلونی در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده می‌گردد (نمودار شماره ۱). نتایج نشان داد که بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳، در تعداد کلونی‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد؛ به‌طوری‌که تعداد کلونی‌ها با افزایش غلظت کمتر شده است (نمودار شماره ۱). همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، اندازه کلونی‌ها در پلیت‌های تیمار شده با کمپلکس ۱، ۲ و ۳ در مقایسه با پلیت کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکرده‌اند، کوچک‌تر می‌باشد.

بررسی مرگ سلولی

سلول‌ها در پلیت ۶ خانه به‌مدت یک هفته تحت تاثیر دوزهای مختلف کمپلکس‌های پالادیوم قرار گرفتند و بعد از رنگ آمیزی با آکریدین اورنج و اتدیوم بروماید سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک مورد بررسی قرار گرفتند (شکل شماره ۳). نتایج این رنگ آمیزی نشان داد که با افزایش غلظت هر سه کمپلکس پالادیوم، درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک نسبت

ایران خریداری شد و در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شد و سپس در انکوباتور، در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد.

ارزیابی مورفولوژی سلولی

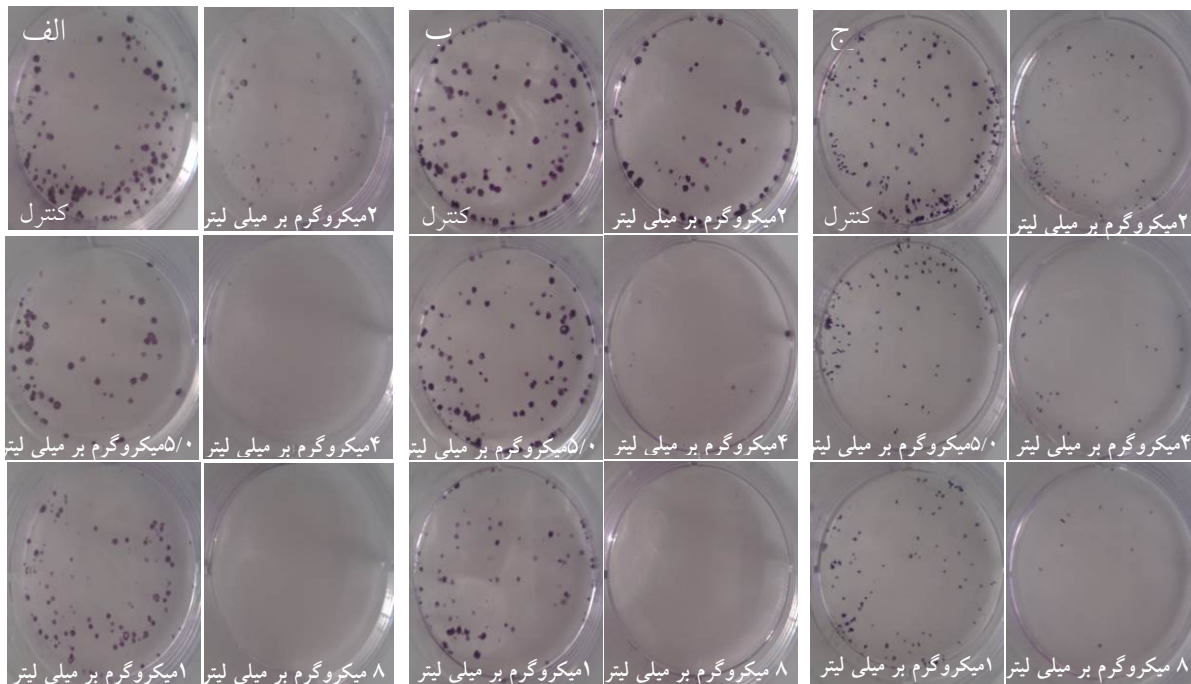
رده سلولی سرطان کبد (HepG2) در پلیت فلاسک T25 کشت داده شد. بعد از گذشت یک هفته آنها را با تریپسین جدا کرده و پس از سانتریفوژ کردن، تعداد ۱۲ هزار سلول در هر پلیت شش خانه به‌مدت هفت روز کشت داده شدند. روز اول محیط کشت سلول‌ها با دوزهای مختلف از سه نوع کمپلکس پالادیومی تعویض شد. بعد از هفت روز، سلول‌ها با مخلوط رنگ آکریدین اورنج (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اتدیوم بروماید (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شدند و ۵ دقیقه بعد با میکروسکوپ فلورئورسنت مدل المپوس تصاویر تهیه گردید. هسته سلول‌های آپوپتوتیک متراکم و قطعه قطعه شده و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل تمایز هستند، علاوه بر آن در این روش، سلول‌های آپوپتوتیک اولیه با هسته‌ی متراکم سبز کم رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم از سلول‌های آپوپتوتیک تاخیری با هسته متراکم قرمز و قطعه قطعه قابل تفکیک می‌باشند. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک‌دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص می‌باشند و سلول‌های سالم نیز به رنگ سبز پر رنگ هستند [۳۰].

ارزیابی تعداد کلونی

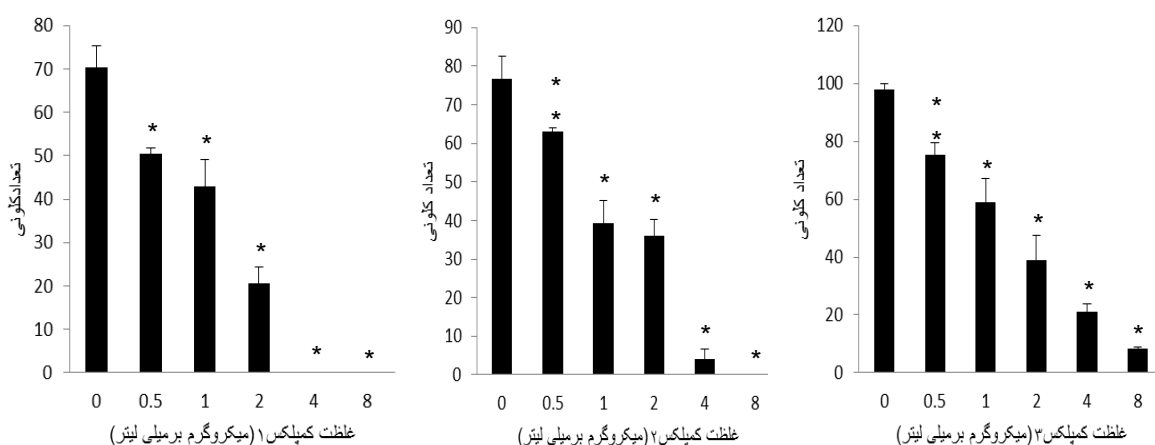
برای ارزیابی کلونی سلولی، ابتدا سلول‌ها را تریپسین و از کف پلیت جدا کرده و تعداد ۱۲۰۰۰ سلول را در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته و آن را در پلیت شش خانه به تعداد ۲۰۰۰ سلول در هر خانه کشت داده و سپس سلول‌ها را به‌مدت یک شب انکوبه کرده تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس، سلول‌ها را در معرض غلظت‌های مختلف سه کمپلکس پالادیومی قرار داده، بعد از ۱۰ روز سلول‌ها با رنگ کریستال ویوله (۰/۵ درصد کریستال ویوله در متانول ۰/۲ درصد) رنگ آمیزی شدند و تصاویری از هر خانه از پلیت شش خانه تهیه شد و کلونی‌ها بیش از ۵۰ سلول با برنامه ImageJ شمارش شدند و اندازه کلونی‌ها به‌صورت ماکروسکوپی از روی این تصاویر مورد بررسی قرار گرفت (کلونی‌هایی که دارای تعداد سلول‌های بیشتری هستند در رنگ آمیزی کریستال ویوله پر رنگ‌تر و بزرگتر دیده می‌شوند) [۳۱].

میکروگرم بر میلی لیتر از کمپلکس های ۱ و ۲ درصد سلول های زنده برابر صفر می باشد و در سلول های تیمار شده با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر از کمپلکس ۳ نیز درصد سلول های زنده بسیار پایین و برابر ۱/۳ درصد می باشد.

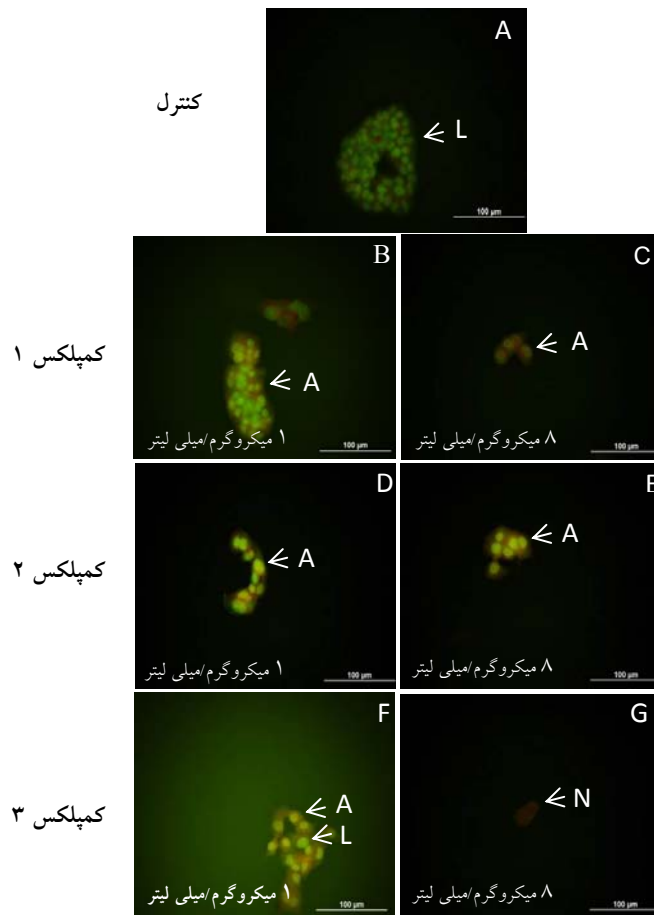
به سلول های سالم افزایش می یابد و در این بین درصد سلول های آپوپتوتیک خیلی بیشتر از درصد سلول های نکروتیک افزایش می یابد. همچنین، جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲ گویای این مطلب است که با افزایش غلظت هر سه کمپلکس تعداد سلول های سرطانی زنده کاهش پیدا می کند؛ به طوری که در غلظت های ۸



شکل شماره ۲- تصویر کلونی های ایجاد شده رده سلولی سرطان کبد (HepG2) بعد از تیمار با غلظت های مختلف کمپلکس های ۱، ۲ و ۳
الف: سلول های تیمار شده با کمپلکس ۱، ب: سلول های تیمار شده با کمپلکس ۲، ج: سلول های تیمار شده با کمپلکس ۳



نمودار شماره ۱- این نمودار تاثیر رقت های مختلف کمپلکس های ۱، ۲ و ۳ بر تعداد کلونی های رده سلولی HepG2 را نشان می دهد. اختلاف معنی داری در بین گروه های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل در هر سه کمپلکس ۱، ۲ و ۳ مشاهده می گردد. ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$)



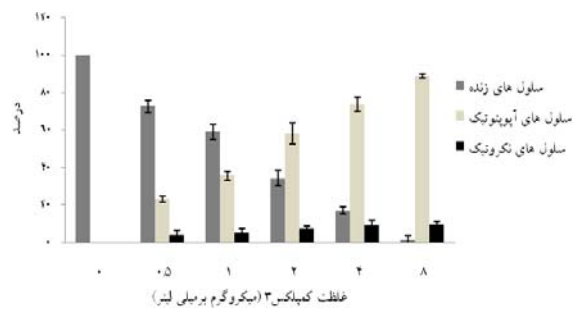
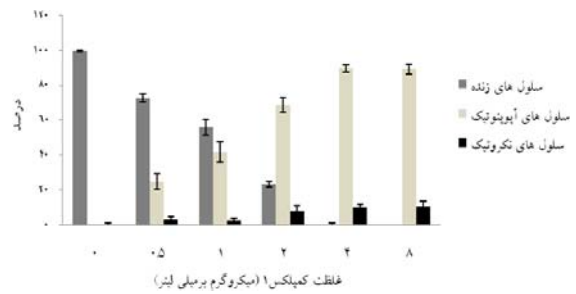
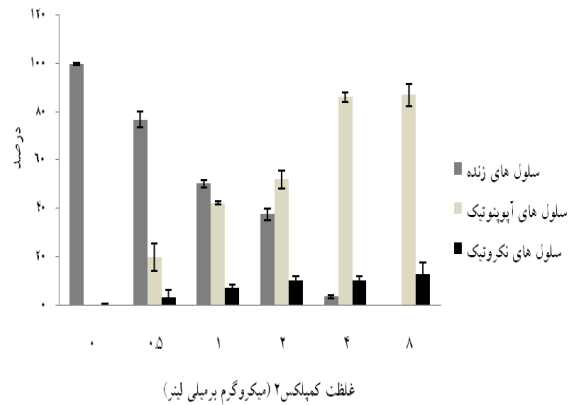
شکل شماره ۳- رنگ آمیزی سلول‌ها با آکریدین اورنج/ اتدیوم بروماید بعد از هفت روز کشت در حضور غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳. بعد از تاثیر غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های فوق، درصد سلول‌های آپپتوتیک و نکروتیک از دوزهای کمتر به دوزهای بیشتر افزایش یافت. همان‌گونه که در این تصویر دیده می‌شود سلول‌های زنده با هسته‌ای سبز رنگ از سلول‌های آپپتوتیک که دارای هسته‌ای زرد رنگ و قطعه قطعه هستند قابل تفکیک می‌باشند. سلول‌های نکروتیک نیز با هسته‌ای قرمز رنگ در شکل مشخص می‌باشد. Live : L, Necrosis : N و Ap:

Apoptosis

جدول شماره ۱- درصد سلول‌های زنده، آپپتوتیک و نکروتیک سلول‌های سرطان کبد که با دوزهای مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ تیمار شده‌اند. هر آزمون سه بار تکرار شده و داده‌های به دست آمده به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده‌اند.

	کمپلکس ۱			کمپلکس ۲			کمپلکس ۳			
	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد سلول- های زنده	درصد سلول- های آپپتوتیک	درصد سلول- های نکروتیک	درصد سلول- های زنده	درصد سلول- های آپپتوتیک	درصد سلول- های نکروتیک	درصد سلول- های زنده	درصد سلول- های آپپتوتیک	درصد سلول- های نکروتیک
۰	۰	۹۹/۷±۰/۶	۰/۰±۰/۰	۰/۳±۰/۶	۹۹/۷±۰/۶	۰/۰±۰/۰	۰/۳±۰/۶	۱۰۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰
۰/۵	۰/۵	۷۲/۷±۲/۵	۲۴/۷±۴/۵	۲/۷±۲/۱	۷۶/۷±۳/۲	۲۰/۰±۵/۶	۳/۳±۳/۲	۷۲/۷±۳/۰	۲۳/۳±۱/۵	۴/۰±۲/۶
۱	۱	۵۶/۰±۴/۴	۴۱/۷±۵/۷	۲/۳±۱/۵	۵۰/۳±۱/۵	۴۲/۳±۰/۶	۷/۳±۱/۱	۵۹/۰±۴/۰	۳۵/۷±۲/۳	۵/۳±۲/۳
۲	۲	۲۳/۳±۱/۵	۶۸/۷±۴/۲	۸/۰±۳/۰	۳۷/۷±۲/۳	۵۲/۰±۳/۶	۱۰/۳±۱/۵	۳۴/۳±۴/۰	۵۸/۳±۵/۵	۷/۳±۱/۵
۴	۴	۰/۳±۰/۶	۸۹/۷±۲/۱	۱۰/۰±۲/۰	۳/۷±۰/۶	۸۶/۰±۲/۰	۱۰/۳±۱/۵	۱۷/۰±۲/۰	۷۳/۷±۳/۸	۹/۳±۲/۵
۸	۸	۰/۰±۰/۰	۸۹/۳±۲/۹	۱۰/۷±۲/۹	۰/۰±۰/۰	۸۷/۰±۴/۶	۱۳/۰±۴/۶	۱/۳±۲/۳	۸۹/۰±۱/۰	۹/۷±۱/۵

سیستین، پنسیل آمین، میتوین، تیوره، تیوسولفات و به خصوص لیگاند شلاته کننده دی اتیل دی تیوکاربامات (DDTC) مورد توجه قرار گرفته است؛ به خاطر اینکه این لیگاندها باعث کاهش سمیت فلزات سنگین بر کلیه و دیگر بافت های بدن می شوند [۲۶،۱۰] و این به علت خاصیت عناصر S و N می باشد که باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می گردد [۲۷،۱۰]. انتظار می رود کمپلکس های مورد استفاده در این تحقیق به علت وجود فلز پالادیوم به جای فلز پلاتین و هم چنین حضور دی اتیل دی تیو- کاربامات در ساختار خود اثر سمی کمتری بر سلول های کلیه داشته باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که این کمپلکس های پالادیوم اثرات سمی بالقوه ای بر روی سلول های سرطانی کبد دارند؛ به طوری که حتی غلظت های پایین این کمپلکس ها (۰/۵ و ۱ میکروگرم) باعث کاهش تعداد کلونی های سلول های سرطانی کبد می شود و در بین این سه کمپلکس اثر سمی کمپلکس ۱ بر روی سلول های سرطانی از دو کمپلکس دیگر بیشتر بوده؛ به طوری که غلظت های ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی لیتر از این کمپلکس باعث عدم تشکیل هرگونه کلونی از سلول های سرطانی کبد شده است. با توجه به اینکه این سه کمپلکس از لحاظ وزن و اندازه مولکولی باهم اختلاف دارند، لذا می توان استنباط کرد که کمپلکس ۱ به خاطر اندازه کوچک تری که دارد، دارای قابلیت بهتری برای تشکیل پیوند اینترکالیشن با DNA می باشد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتدیوم بروماید نشان داد که هر سه کمپلکس در غلظت های پایین باعث آپوتوز و نکروز سلول ها می شوند؛ به طوری که این کمپلکس ها در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث القا آپوتوز در سلول های زنده گردیدند و هرچه غلظت دوزها افزایش پیدا می کرد بر درصد سلول های آپوتوتیک افزوده می شد، به نظر می- رسد جایگزینی ۱۰۰۱- فنانترویلین به جای ۲۰۲- بای پیریدین که در بعضی از کمپلکس های فلزی وجود دارد باعث افزایش فعالیت ضد سرطانی این کمپلکس ها می شود [۲۹]. موقعیت جاننشینی گروه ها بر روی لیگاندهای فلزی، نقش مهمی در تعیین فعالیت های ضد سرطانی این کمپلکس های سنتز شده ایفا می کند [۳۲]. در مطالعه مشابهی ترشیزی و همکاران تاثیر دو کمپلکس جدید پلاتینیوم و پالادیوم را بر رده سلولی K562 بررسی کرده و آن را با سیس پلاتین مقایسه کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که این دو ترکیب اثرات ضد سرطانی بیشتری نسبت به سیس پلاتین دارند. چرا که سلول های این رده حساسیت متفاوتی را در مقابل این دو کمپلکس سنتز شده نشان دادند [۳۳]. در مطالعه آریان پور و همکاران سه کمپلکس پالادیوم جدید روی سه رده سلولی کبد، ریه و تخمدان مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه با سیس پلاتین



نمودار شماره ۲- مقایسه تعداد سلول های زنده، آپوتوتیک و نکروتیک در رده سلولی HepG2 تیمار شده با غلظت های مختلف کمپلکس های ۱، ۲، و ۳.

بحث

در دهه ۱۹۶۰ با مطالعات گسترده ای که روی موش های آزمایشگاهی صورت گرفت مشخص گردید که سیس پلاتین-*cis* [diamminedichloroplatinum (II) or *cis*-DDP] دارای خاصیت ضد سرطانی بوده و ایزومر ترانس آن فاقد این اثر بوده و عملاً غیرفعال می باشد. با این حال استفاده از این دارو به لحاظ اینکه به بسیاری از بافت های سالم بدن آسیب می زند، محدودیت های قابل توجهی دارد. این محدودیت ها باعث شده است تا تلاش هایی جهت ساخت داروهایی بر پایه پلاتین یا پالادیوم انجام شود که نسبت به سلول های طبیعی دارای سمیت کم و نسبت به سلول های سرطانی قدرت تخریبی بالا داشته باشد. بنابراین، استفاده از دیگر فلزات گروه پلاتین نظیر پالادیوم، روتنیوم، رودیم، اسمیوم و ایریدیوم در تحقیقات مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. هم چنین، استفاده از کمپلکس های حاوی لیگاند سولفوردار مانند

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که کمپلکس‌های دی-تیوکارباماتی پالادیوم بر روی مورفولوژی سلول‌های سرطانی تاثیر بالایی داشته و قادر به القای آپوپتوز بوده و هم‌چنین، از کلونی-زایی سلول‌های رده سلولی سرطان کبد می‌کاهد. این کمپلکس‌ها می‌توانند بعد از انجام مطالعات تکمیلی در شرایط درون‌تنی به-عنوان داروی جایگزین مناسب برای درمان سرطان کبد محسوب شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کمیته تحقیقات دانشجویی و مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و مدیریت محترم گروه علوم تشریحی و فیزیولوژی و فارماکولوژی به‌خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نماید. مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه ثبت شده در شورای پژوهشی دانشکده پزشکی اردبیل می‌باشد.

References:

- [1] Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325(10): 675-80.
- [2] Bosch FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3): 271-285
- [3] Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, et al. Randomised trial of effects of interferon- α on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346(8982): 1051-5.
- [4] Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(17): 6547-9.
- [5] Benvegnù L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer* 1994; 74(9): 2442-8.
- [6] Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31(4): 339-46.
- [7] Talamo TS, Dekker A, Gurecki J, Singh G. Primary hepatic malignant lymphoma: its occurrence in a patient with chronic active hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma associated

مقایسه گردید. در این مطالعه رده سلولی سرطان ریه (A549) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس [Pd(bpy)(Bu-)]Cl (dte) و رده سلولی سرطان کبد (HepG2) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس [Pd(bpy)(hex-dte)]Cl از خود نشان داد. هم‌چنین، رده سلولی سرطان تخمدان (OV2008) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس [Pd(bpy)(Bu-dtc)]Cl از خود نشان داد [۱۰]. با توجه به تفاوت ساختاری و اندازه مولکولی کمپلکس‌های جدید پالادیوم مورد مطالعه در این تحقیق با سه کمپلکس پالادیوم جدید مورد مطالعه در تحقیق آریان‌پور و همکاران این امکان وجود دارد که این کمپلکس‌ها اثرات متفاوتی را بر سلول‌های سرطانی اعمال نمایند. Kontek و همکاران نشان دادند که کمپلکس جدید سنتز شده پالادیوم با فرمول عمومی diethyl(pyridin-2-trans-[PdCl₂(2-pmOpe)2]ylmethyl)phosphates در ساختمان خود می‌باشد. باعث تغییرات مورفولوژیک رده‌های سلولی سرطانی A549 و HT29 می‌گردد. در این رده‌های سلولی این کمپلکس قادر به القاء آپوپتوز و نکروز در سلول‌ها بود [۳۴].

- with hepatitis B viral infection. *Cancer* 1980; 46(2): 336-9.
- [8] Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J Biol Chem* 1967; 242(6): 1347-52.
 - [9] Turánek J, Kašná A, Záluská D, Neca J, Kvardová V, Knötigová P, et al. New platinum (IV) complex with adamantylamine ligand as a promising anti-cancer drug: comparison of in vitro cytotoxic potential towards A2780/cisR cisplatin-resistant cell line within homologous series of platinum (IV) complexes. *Anticancer Drugs* 2004; 15(5): 537-43.
 - [10] Aryanpour N, Mansouri-Torshizi H, Nakhjavan M, H Shirazi F. 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.
 - [11] 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.
 - [12] Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999; 17(1): 409-22.
 - [13] Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer

- treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42(3): 317-25.
- [14] Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998; 34(10): 1522-34.
- [15] Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 2003; 103(3): 645-62.
- [16] Baik MH, Friesner RA, Lippard SJ. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc* 2003; 125(46): 14082-92.
- [17] Reedijk J, Lohman PH. Cisplatin: synthesis, antitumor activity and mechanism of action. *Pharm Weekbl* 1985; 7(5): 173-80.
- [18] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* 1999; 99(9): 2467-98.
- [19] Divsalar A, Saboury AA, Ahadi L, Zemanatiyar E, Mansouri-Torshizi H. Investigation of effects of newly synthesized Pt (2) complex against human serum albumin and Leukemia cell line of K562. *BMB Rep* 2010; 43(11): 766-71.
- [20] Reedijk J. The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs. *Pure Appl Chem* 1987; 59(2): 181-92.
- [21] Lempefis EL, Reedijk J. Interactions Of Platinum Amin Compounds With Sulfur-containing Biomolecules and DNA Fragments. *Adv Inorg Chem* 1992; 37: 175.
- [22] To KK, Au-Yeung SC, Ho YP. Differential nephrotoxicity of cisplatin and a novel series of traditional Chinese medicine-platinum anticancer agents correlates with their chemical reactivity towards sulfur-containing nucleophiles. *Anticancer Drug* 2006; 17(6): 673-83.
- [23] Berry JM, Jacobs C, Sikic B, Halsey J, Borch RF. Modification of cisplatin toxicity with diethyldithiocarbamate. *J Clin Oncol* 1990; 8(9): 1585-90.
- [24] Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol* 1998; 9(1): 13-21.
- [25] Markman M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. *Expert Opin Drug Saf* 2003; 2(6): 597-607.
- [26] Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* 2003; 23(5): 633-55.
- [27] Mansouri-Torshizi H. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(21): 9616-25.
- [28] 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): 173-7.
- [29] 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.
- [30] Hadizadeh S, Najafzadeh N, Mazani M, Amani M, Mansouri-Torshizi H, Niapour A. Research Article Cytotoxic Effects of Newly Synthesized Palladium (II) Complexes of Diethyldithiocarbamate on Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Biochem Res Int* 2014; 2014(2014): 9.
- [31] Mahdavi-rad M, Najafzadeh N, Ali Niapour A, Jafari A. Cytotoxicity of ZnO and Ag/ZnO nanocomposites on malignant melanoma cell line (A375). *Arak Med Univ J* 2014; 17(6): 74-83. [in Persian]
- [32] Bowen RJ, Caddy J, Fernandes MA, Layh M, Mamo MA, Meijboom R. Synthesis and characterisation of dialkyltin 2, 3-bis (diphenylphosphino) maleic acid adducts. *J Organomet Chem* 2006; 691(4): 717-25.
- [33] Mansouri-Torshizi H, I-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.
- [34] Kontek R, Matawska-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.