# بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی کمپلکس فلزی پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) روی سلول‌های سرطان دهانه رحم

سید حسین سیدمرادی[۱]، احمدرضا بهرامی[۱،۲،۳]، مسعود میرزائی[۴]، مریم مقدم متین[۱،۲،۳]*
۱-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲-گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۳-گروه تحقیقاتی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی
۴-گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
hossein.seyyedmoradi@mail.um.ac.ir

## چکیده

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در زنان و به‌طورکلی هفتمین سرطان شایع در جهان است. شیمی‌درمانی در سرطان دهانه رحم به‌عنوان درمان اولیه در نظر گرفته می‌شود. شیمی‌درمانی با کمپلکس‌های پلاتین جزو درمان‌های مؤثر بوده اما استفاده از سیس پلاتین و آنالوگ‌های آن هنوز با مشکلاتی همراه است. این مشکلات این انگیزه را برای طراحی و سنتز کمپلکس‌های فلزی جدید به وجود می‌آورد. در این پژوهش برای اولین بار به بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی کمپلکس فلزی پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) بر رده‌ی سلولی سرطان دهانه رحم "HeLa" و سلول‌های طبیعی "HDF" پرداخته‌شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف این ترکیب به رده‌های سلولی مورد نظر در طی بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر داده شده و سپس زنده‌مانی سلول‌ها توسط آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که $IC_{50}$ کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) برای سلول‌های HeLa پس از ۴۸ ساعت تیمار حدود ۵ $\mu g/ml$ بود، در حالی که $IC_{50}$ سیس پلاتین پس از ۴۸ ساعت حدود ۳ $\mu g/ml$ محاسبه شد. همچنین نتایج حاصل از بررسی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) اثرات سمیت سلولی کمتری بر روی سلول‌های نرمال HDF نشان داد؛ بدین‌صورت که $IC_{50}$ این ترکیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب ۱۳، ۱۷و ۱۰ $\mu g/ml$ محاسبه شد. نتایج حاصل از سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) این چشم‌انداز را به وجود می‌آورد که با بررسی رابطه ساختار-اثر آن بتوان بخش فارماکوفور را شناسایی کرده و به دنبال آن به ترکیباتی که خواص ضدسرطانی بهتری نسبت به سیس پلاتین دارند، دست‌یافت.

کلمات کلیدی: داروی ضدسرطان، عوامل سمیت سلولی، کمپلکس‌های فلزی نقره، رده سلولی HeLa، رده سلولی HDF

## مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در زنان و به‌طورکلی هفتمین سرطان شایع در جهان است. تقریباً ۹ مورد از هر ۱۰ مورد (۸۷٪) مرگ ناشی از سرطان رحم در مناطق کمتر توسعه‌یافته رخ می‌دهد (Ferlay et al., 2015). شیمی‌درمانی به‌عنوان یک درمان استاندارد برای سرطان‌های پیشرفته و متاستاتیک و درمان اولیه در سرطان دهانه رحم در نظر گرفته می‌شود (Movva et al., 2009). استفاده از کمپلکس‌های پلاتین در این روش درمانی منجر به تأثیرگذاری بهتر آن نیز می‌شود که در این بین کمپلکس‌هایی مانند سیس پلاتین[۱] کربوپلاتین[۲] و اگزالیپلاتین[۳] برای استفاده بالینی مورد تائید قرارگرفته‌اند

[۱] Cisplatin

(Galanski & Jakupec, 2005). اگرچه در روند درمان ۷۰٪ بیماران سرطانی از سیس پلاتین استفاده می‌شود، اما شیمی‌درمانی با سیس پلاتین و آنالوگ‌های آن هنوز با مشکلاتی مواجه است که ازجمله آن‌ها می‌توان به اثرات سمیت جانبی و عدم فعالیت یا مقاومت دارویی در بعضی از سرطان‌ها اشاره نمود (Bruijnincx & Sadler, 2008). این مشکلات این انگیزه را به وجود می آورد که با طراحی و سنتز کمپلکس‌هایی با فلزات و لیگاندهای متفاوت بتوان فعالیت‌های زیستی گوناگونی را ایجاد کرد که به‌عنوان ویژگی‌های درمانی خاص مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین می‌توان از سایر فلزات جایگزین مانند نقره، روتنیوم، آهن، تیتانیم، وانادیم، منگنز، روی و مس برای سنتز کمپلکس‌های فلزی استفاده نمود (Clarke et al., 1999;Fish & Jaouen, 2003). اخیراً، اثرات ضدسرطانی کمپلکس‌های نقره در محیط برون تنی گزارش شده‌اند. بر اساس مطالعات انجام شده اثرات ضدسرطانی استخلاف‌های کومارینی نقره (Thati et al., 2007)، دایمرهای کربوکسیلات نقره (Zhu et al., 2003) و نیز کمپلکس‌های فسفین نقره حتی بر رده‌های سلولی مقاوم به سیس پلاتین اثبات شده است (Liu et al., 2008). در این پژوهش برای اولین بار به بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی کمپلکس فلزی پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) روی سلول‌های سرطان دهانه رحم پرداخته شد. در این ترکیب از فلز نقره در جایگاه اتم مرکزی و پیریدین دی کربوکسیلیک‌اسید[۴] به‌عنوان لیگاندهای احاطه‌کننده اتم مرکزی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری سلول‌های HeLa و HDF

سلول‌های HeLa در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و سلول‌های HDF در محیط کشت DMEM-high glucose دارای ۱۰٪ سرم جنینی گاو و در دمای ۳۷°C و ۵٪ $CO_2$ کشت داده شدند. به‌منظور پاساژ سلول‌ها از محلول trypsin-EDTA ۰/۲۵٪ جهت جداسازی آن‌ها استفاده شد.

آماده‌سازی غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I)

ابتدا ۱/۵ mg از این ماده در ۷۵۰ µl آب دیونیزه حل شد، سپس با رقت سازی سریالی غلظت‌های نهایی (۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu g/ml$) برای تیمار سلول‌ها ساخته شدند.

آزمون زیستایی

به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I)، سلول‌های HeLa (cells/well $10^4 \times 1/3$) و سلول‌های HDF (cells/well $10^3 \times 8$) ۲۴ ساعت قبل از تیمار در ظرف‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. علاوه بر ماده موردنظر اثرات سمیت سلولی سیس پلاتین نیز در غلظت‌های مشابهی مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است ازآنجایی‌که حلال کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) و سیس پلاتین آب است به ترتیب محیط کشت ۲/۵٪ و ۵٪ رقیق‌تر به سلول‌ها اثر داده شد که به عنوان خط مبنا[۵] در محاسبات زیستایی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از

---

[۲] Carboplatin

[۳] Oxaliplatin

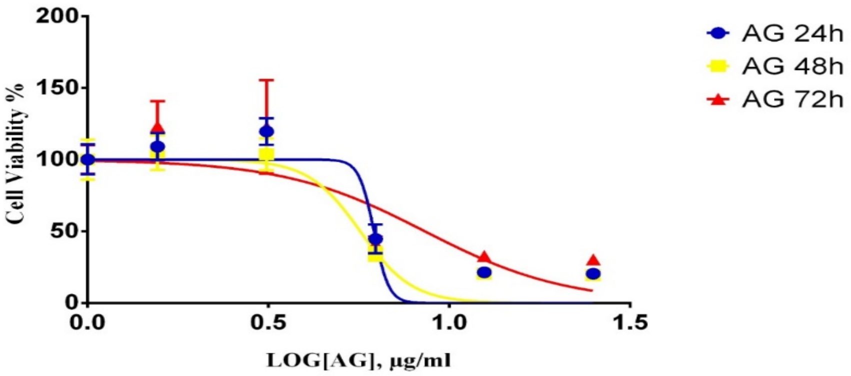
[۴] Pyridinedicarboxylic acid

[۵] Base line

تیمار، ۱۰٪ حجم کل هر خانه محلول MTT ( $5\ \mu g/ml$) به هر خانه اضافه شده و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه گذاری شدند. پس از تشکیل بلورهای فورمازان در ۱۵۰µl DMSO به هر چاهک اضافه شد. درنهایت جذب خانه‌ها در طول موج ۵۴۵ nm توسط دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد.

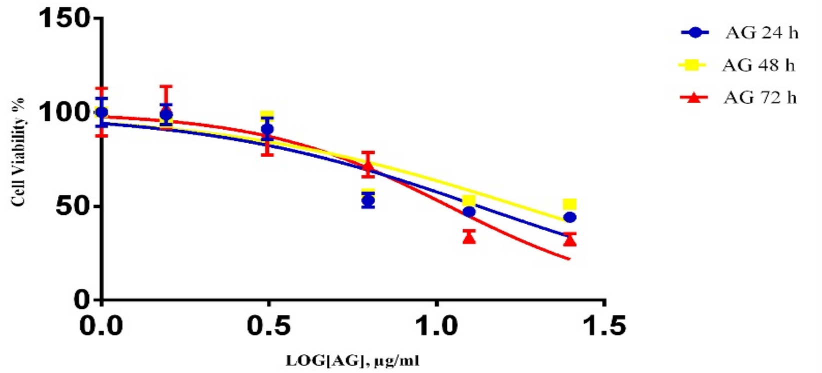
نتایج و بحث

به‌منظور تعیین $IC_{50}$ و بررسی بقای رده‌های سلولی، نتایج حاصل از آزمون MTT توسط نرم‌افزار Graph Pad prism 6 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. اثر این ترکیب روی درصد بقای سلول‌های سرطانی HeLa بررسی شده و نمودار دوز–پاسخ برای غلظت‌های مختلف رسم گردید (نمودار ۱). درنهایت $IC_{50}$ کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب ۶٫۵ و ۸ $\mu g/ml$ محاسبه شد.



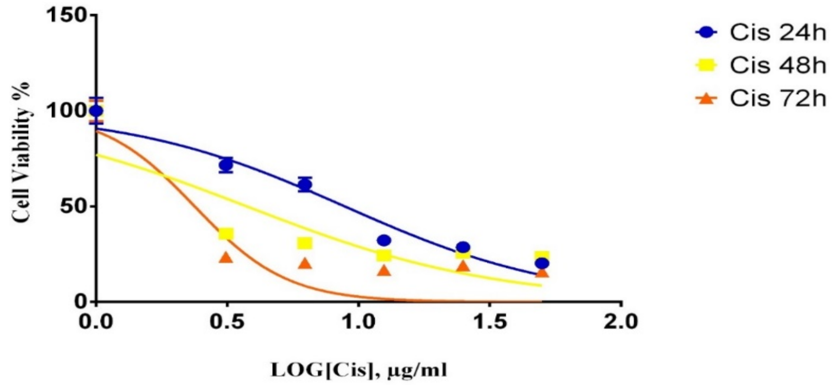

نمودار ۱– نمودار دوز–پاسخ تیمار سلول‌های HeLa در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I)،. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

از سوی دیگر، اثر غلظت‌های مختلف این ترکیب بر درصد بقای سلول‌های نرمال HDF بررسی شد و نمودار دوز–پاسخ برای غلظت‌های مربوطه رسم گردید (نمودار ۲). درنهایت $IC_{50}$ این ترکیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب ۱۳، ۱۷ و ۱۰ $\mu g/ml$ محاسبه شد.




نمودار ۲– نمودار دوز–پاسخ تیمار سلول‌های HDF در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I)،. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

به منظور مقایسه اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) با سایر داروهای مورداستفاده در درمان سرطان دهانه رحم، سلول‌های HeLa در بازه‌های زمانی مشابه با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین تیمار شدند. سپس درصد بقای سلولی بررسی شد و در ادامه نمودار دوز-پاسخ اثرات سیس پلاتین روی سلول‌های HeLa رسم گردید (نمودار ۳) و $IC_{50}$ آن پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸، ۳ و ۲ µg/ml به دست آمد.




نمودار ۳- نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های HeLa در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت اثر غلظت‌های مختلف سیس پلاتین. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

با بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو نقره(I) بر سلول‌های سرطان دهانه رحم، مشخص شد سمیت سلولی حاصل از این ترکیب با اثرات داروی رایج سیس پلاتین قابل‌مقایسه است و همچنین اثرات سمیت کمتری روی سلول‌های نرمال HDF دارد. در مطالعات آینده این امکان وجود دارد که با بررسی رابطه ساختار-اثر این ترکیب بتوان بخش فارماکوفور آن را شناسایی کرد و به دنبال آن به ترکیباتی که خواص ضدسرطانی بهتر و عوارض جانبی کمتری نسبت به سیس پلاتین دارند، دست‌یافت.

منابع

**Bruijnincx, P. C., & Sadler, P. J. (2008)**. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*, *12*(2), 197–206.

**Clarke, M., Zhu, F., & Frasca, D. (1999)**. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, *99(9)*, 2511-34.

**Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., … Bray, F. (2015)**. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386.

**Fish, R., & Jaouen, G. (2003)**. Bioorganometallic chemistry: structural diversity of organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with. *Organometallics, 22 (11)*, 2166–2177.

**Galanski, M., & Jakupec, M. (2005)**. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Current Medicinal Chemistry, 12(18)*, 2075-94.

**Liu, J., Galettis, P., Farr, A., & Maharaj, L. (2008)**. In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au (I) and Ag (I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *Journal of Inorganic Chemistry*, *102(2)*, 303–310.

**Movva, S., Rodriguez, L., Arias-Pulido, H., & Verschraegen, C. (2009)**. Novel chemotherapy approaches for cervical cancer. *Cancer*, *115*(14), 3166–3180.

**Thati, B., Noble, A., Creaven, B., Walsh, M., & McCann, M. (2007)**. RETRACTED: In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based. *Cancer Letters*, *248(2)*, 321-31.

**Zhu, H., Zhang, X., Liu, X., Wang, X., & Liu, G. (2003)**. Clear Ag–Ag bonds in three silver (I) carboxylate

complexes with high cytotoxicity properties. *Inorganic Chemistry, 6(8),* 1113–1116.

# Investigating Cytotoxic and Anticancer Properties of pyridinedicarboxylato Ag(I) Complex on HeLa Cervical Cancer Cells

Hossein S. Moradi[1], Ahmad Reza Bahrami[1,2,3], Masoud Mirzaei [4]
Maryam M. Matin [1,2,3*]

1-Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2-Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
3-Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
**hosseinmoradiran@gmail.com**

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women, and the seventh overall most common cancer in the world. In cervical cancer, chemotherapy is considered as the first-line treatment. This procedure is effectively done with platinum complexes, although chemotherapy with cisplatin and its analogues still suffers from several drawbacks. As a result, it provides the impetus for the development of new metal complexes with better anticancer activity potential.

In this study, we investigated the cytotoxic effects and anticancer activity of Ag pyridine complex on cervical cancer (HeLa) and normal (HDF) cell lines for the fist time. To do so, cells were treated with various concentrations of this compound for 24, 48 and 72 hours. Then, cell viability was evaluated by MTT assay. The results of the MTT assay showed that pyridinedicarboxylato Ag(I) complex had cytotoxic effects on HeLa cells with $IC_{50}$ value of about 5 µg/ml after 48 hours of treatment. Moreover, $IC_{50}$ value of cisplatin was approximately 2 µg/ml after 48 hours of treatment. In addition, the results indicated that pyridinedicarboxylato Ag(I) complex had lower cytotoxic effects on normal HDF cells with $IC_{50}$ values of about 13, 17 and 10 µg/ml after 24, 48 and 72 hours of treatment, respectively. The results indicate that understanding of structure–activity relationship is considered as a prospective investigation so as to find a more effective drug compered to cisplatin.

Keywords: Anti-cancer Drugs, Cytotoxic Agents, Silver Metal Complexes, HeLa cell Line ،HDF Cell Line