اثر سمیت و کشندگی سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلاتو مس(II) روی رده‌های سلولی سرطان‌های کولون و پستان موشی

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

در حوزه شیمی معدنی دارویی توجه روز افزونی به طراحی ترکیبات بر پایه فلز به‌عنوان عوامل درمانی می‌شود. پتانسیل ضدسرطانی این ترکیبات تنها پس از کشف سیس پلاتین به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت. تا به امروز، این داروی ضد سرطان یکی از مؤثرترین عوامل شیمی‌درمانی بوده است. بااین‌حال استفاده بالینی از آن به‌شدت توسط عوارض جانبی، سمیت سیستمیک بالا و مقاومت به دارو محدود می‌شود. با این فرض که فلزات داخل سلولی ممکن است سمیت کمتری داشته باشند، تحقیقات زیادی روی کمپلکس‌های مس به‌عنوان عوامل ضدسرطان انجام‌شده است. در این پژوهش برای اولین بار به بررسی اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی رده‌های سلولی سرطانی موشی شامل CT26، C26، 4T1 و Tubo پرداخته شد. بدین منظور این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف این کمپلکس در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته تیمار شدند. سپس مرگ و میر سلولی با آزمون MTT بررسی شده و IC_{50} برای رده‌های سلولی CT26، C26، 4T1 و Tubo پس از ۴۸ ساعت تیمار به ترتیب ۳۹، ۳۶، ۲۴ و ۲۸ $\mu g/ml$ محاسبه شد. نتایج حاصل از این مطالعه اثرات مشابه سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) را روی سلول‌های مورد بررسی نشان داد، این امکان وجود دارد که بتوان با تغییر ساختار شیمیایی این کمپلکس به ترکیبی با سمیت سلولی بیشتر دست یافت.

کلمات کلیدی: داروهای بر پایه فلز، کمپلکس مس، رده‌های سلولی سرطانی موشی

مقدمه

در حوزه شیمی معدنی دارویی توجه روز افزونی به طراحی ترکیبات بر پایه فلز به‌عنوان عوامل درمانی می‌شود که سنتز آن‌ها به‌راحتی توسط ترکیبات آلی امکان‌پذیر نیست (Hambley, 2007). اگرچه مدت طولانی است که فلزات برای مقاصد پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Thompson & Orvig, 2006)، اما پتانسیل ضدسرطانی آن‌ها تنها پس از کشف فعالیت‌های زیستی سیس پلاتین به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت (Jung & Lippard, 2007). تا به امروز، این داروی ضدسرطان یکی از مؤثرترین عوامل شیمی‌درمانی بوده است. بااین‌حال استفاده بالینی از سیس پلاتین به‌شدت توسط عوارض جانبی، سمیت سیستمیک بالا و مقاومت به دارو محدود می‌شود (Jung & Lippard, 2007; Zutphen & Reedijk, 2005). با این فرض که فلزات داخل سلولی[۱] ممکن است سمیت کمتری داشته باشند، تحقیقات زیادی روی کمپلکس‌های مس انجام شده است و این کمپلکس‌ها به‌طور بالقوه به‌عنوان عوامل ضدسرطان در نظر گرفته می‌شوند (Marzano et al., 2009). کربوکسیلیک اسیدها،

[1] endogenous metals

یک کلاس از لیگاندهای بسیار مهم از لحاظ زیستی هستند.این اثبات شده است که اتصال مناسب گروه کربوکسیلیک اسید در کمپلکس می‌تواند در حلالیت ، انتقال سلولی، فعالیت ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی کمپلکس مؤثر باشد (Galanski & Keppler, 1996). در این پژوهش به بررسی اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی رده‌های سلولی موشی CT26، C26، 4T1 و Tubo پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های رده موشی CT26، C26 و 4T1 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و سلول‌های Tubo در محیط کشت DMEM-high glucose دارای ۲۰٪ سرم جنینی گاو، دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 نگه‌داری شدند. به‌منظور پاساژ سلول‌ها از بافر نمکی فسفات (PBS) برای شستن سلول‌ها و از محلول trypsin-EDTA ۰/۲۵٪ جهت جداسازی آن‌ها استفاده گردید.

تهیه غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II)

به‌منظور تهیه غلظت‌های مختلف از ترکیب پیریدین دی کربوکسیلات مس(II)، ابتدا ۲ mg از این ماده در ۱۰۰۰ µl آب دیونیزه حل شد، سپس با رقت سازی سریالی با نسبت حجمی یک به یک از محلول ذخیره اولیه، محلول‌های ذخیره‌ی بعدی تهیه شد. درنهایت محلول‌های ذخیره به وسیله محیط کشت رقیق شدند و غلظت‌های نهایی (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml) برای تیمار سلول‌ها ساخته شدند.

آزمون زنده‌مانی سلولی

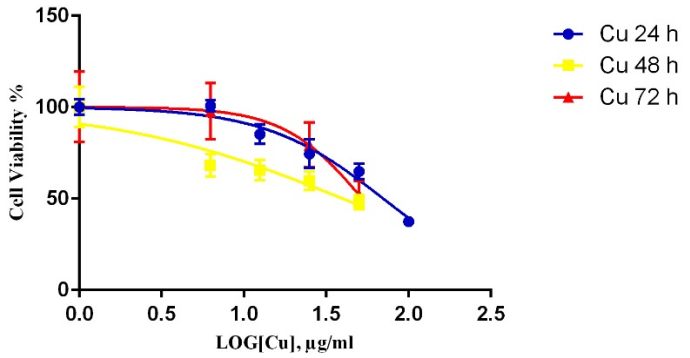
سلول‌های CT26 با تعداد ۱۴۰۰۰، C26 ۱۳۰۰۰، 4T1 ۸۰۰۰ و Tubo ۱۳۰۰۰ سلول در هر چاهک از ظرف‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت غلظت‌های ساخته شده به سلول‌ها اثر داده شدند. به‌منظور حذف اثر حلال، محیط کشت حاوی ۲/۵٪ آب دیونیزه به سلول‌ها اثر داده شد که به عنوان کنترل در محاسبات زیستایی در نظر گرفته شد. به‌منظور بررسی مرگ و میر سلولی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲۰ µl (۱۰٪ حجم کل هر خانه) محلول MTT (۵ µg/ml) به هر خانه اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه گذاری شدند. پس از تشکیل بلورهای فورمازان محتویات چاهک تخلیه شد و ۱۵۰ µl DMSO برای حل کردن بلورها به هر چاهک اضافه شد. درنهایت جذب در طول موج ۵۴۵ nm توسط دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده از آزمون MTT توسط نرم‌افزار GraphPad prism 6 مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد زنده‌مانی برای غلظت‌های مختلف ماده مورد نظر مشخص شد. درنهایت IC_{50} نیز به کمک این نرم‌افزار برای ترکیب و رده‌های سلولی مورد نظر طی بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد.

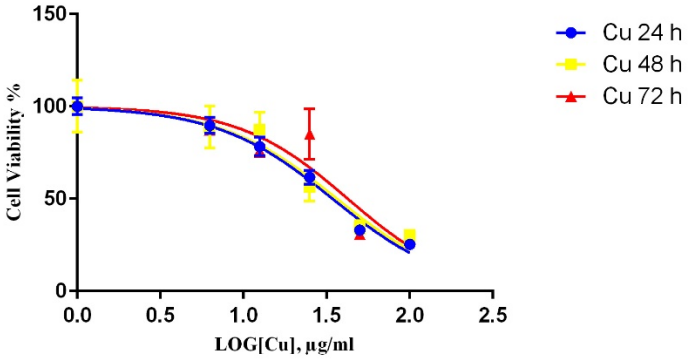
نتایج و بحث

به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II)، غلظت‌های مختلف از این ترکیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های سرطانی مورد نظر اثر داده شدند و زنده‌مانی سلول‌ها به کمک آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده اثرات مشابه سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی سلول‌های مورد بررسی بود. بدین‌صورت که IC50 کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی سلول‌های CT26 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب حدودا ۷۰، ۳۹ و ۵۲ $\mu g/ml$ محاسبه شد و نمودار دوز –پاسخ آن نیز رسم گردید (شکل ۱).



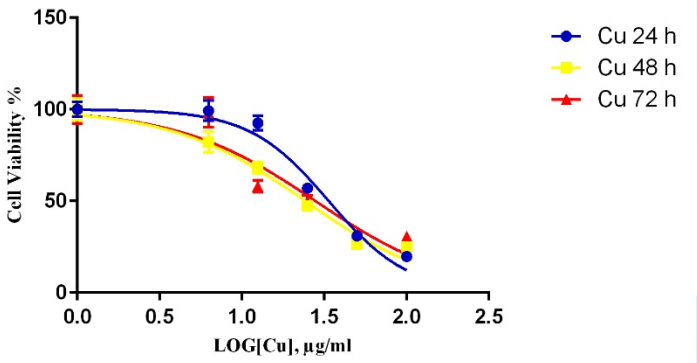
شکل ۱- نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های CT26 تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

همچنین رشد سلول‌های C26 که تحت تیمار کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) قرارگرفته بودند در مقایسه با کنترل، مهار شد و IC_{50} آن‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب حدود ۳۴، ۳۶ و ۴۲ $\mu g/ml$ به دست آمد (شکل ۲).



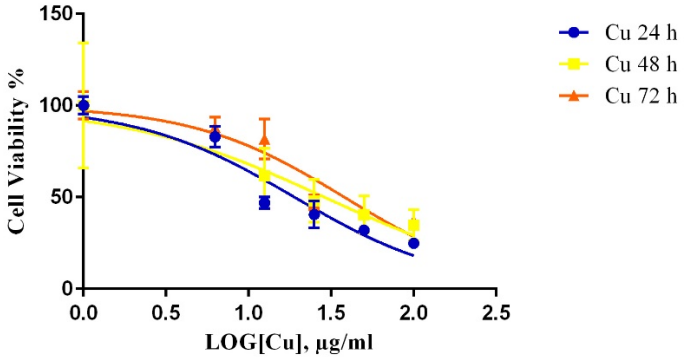
شکل ۲- نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های C26 تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی سلول‌های 4T1 نیز دارای اثرات سمیت سلولی بود. پس از تجزیه و تحلیل آماری نمودار دوز-پاسخ آن رسم گردید و IC_{50} بعد از تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب تقریبا ۳۳، ۲۴ و ۲۸ $\mu g/ml$ محاسبه شد (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های 4T1 تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

نتایج حاصل از تیمار سلول‌های Tubo نیز نشان دهنده اثرات سمیت سلولی کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) روی این سلول‌ها بود، بدین صورت که IC_{50} این ترکیب پس از تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته به ترتیب حدود ۳۹، ۲۸ و ۳۸ $\mu g/ml$ محاسبه شد و نمودار دوز–پاسخ آن نیز رسم گردید (شکل ۴).



شکل ۴- نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های Tubo تحت اثر غلظت‌های مختلف کمپلکس پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه SEM می‌باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد کمپلکس فلزی پیریدین دی کربوکسیلات مس(II) دارای اثرات سمیت سلولی در چندین رده سلول سرطانی موشی است. همچنین این امکان وجود دارد که بتوان با تغییر استخلاف‌های این کمپلکس به ترکیبی با سمیت سلولی بیشتر دست یافت.

منابع

Galanski, M., & Keppler, B. (1996). Carboxylation of dihydroxoplatinum (IV) complexes via a new synthetic pathway. *Inorganic Chemistry,* .

Hambley, T. W. (2007). Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. *Dalton Transactions*, (43), 4929.

Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chemical Reviews*, *107*(5), 1387–1407.

Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., & Santini, C. (2009). Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *9*(2), 185–211.

Thompson, K. H., & Orvig, C. (2006). Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in

drug design. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, (6), 761–4.
Zutphen, S. van, & Reedijk, J. (2005). Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. *Coordination Chemistry Reviews, 249(24),* 2845-2853.

Investigation the cytotoxic effects of pyridinedicarboxylato Cu(II) complex on different cancerous mouse cell lines

Seyyed Hossein Seyyedmoradi[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- Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
4- Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

hosseinmoradiran@gmail.com

Abstract

In the field of medicinal inorganic chemistry, an increasing attention has been paid to the design of metal-based compounds as therapeutic agents. The anticancer potential of these compounds was fully examined after the discovery of cisplatin, which still remains one of the most effective chemotherapeutic agents. However, the clinical use of cisplatin is severely limited by side effects, systemic toxicity and drug resistance. Many studies have been done on copper complexes as anticancer agents with this assumption that endogenous metals may have less toxicity. In this study, the cytotoxic effects of complex pyridine dicarboxylate cu (II) was investigated on CT26, C26, 4T1 and Tubo mouse cell lines. For this purpose, these cells were treated with different concentrations of this complex for 24, 48 and 72 hours. Then, cell death was assessed by MTT assay and IC_{50} values for CT26, C26, 4T1, Tubo cell lines were roughly calculated as 39, 36, 24 and 35 µg / ml after 48 hours of treatment, respectively. The results of this study showed the same effects on the cell toxicity of complex pyridinedicarboxylato Cu (II) on the target cells. So, it is possible to achieve a compound with higher cell toxicity effect by altering the chemical structure of this complex.
Keywords: Metal-base Drugs, Cytotoxic Agents, Copper Complexes, Cancerous mouse cell lines