

بررسی اثرهای ضد تکثیری و القاء آپوپتوز کمپلکس های نیکل با لیگاندهای مالتول،

دیفریپرون و ۳-هیدروکسی فلاون بر روی چند رده سلول سرطانی

شمیلا آزموده، محمد ایزدیاری*، امیر شکوه سلجوقی*، مریم بابایی

گروه شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مطالعه ها نشان داده اند که برخی لیگاندها نظیر مالتول با کثوردینه شدن با فلزها، موجب القاء آپوپتوز و مهار تکثیر سلول های سرطانی می شود. هدف از این مطالعه، سنتز کمپلکس های جدیدی از نیکل و ارزیابی اثرهای آپوپتیک و ضد تکثیری این ترکیب ها می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، کمپلکس هایی از نیکل و لیگاندهای مالتول، دیفریپرون و ۳-هیدروکسی فلاون سنتز گردید. سایتوتوکسیسیته این کمپلکس ها به منظور ارزیابی فعالیت ضدسرطانی آن بر روی رده های HeLa، MCF-7، MDA-MB-231، NALM-6، Neuro-2a و L929 با روش MTT و فلوسایتومتری، بررسی گردید.

یافته ها: $IC_{50} \pm SD$ (μM) به دست آمده از اثر کمپلکس های ۱ تا ۳ بر روی رده های سلولی HeLa، MCF-7، MDA-MB-231، NALM-6، Neuro-2a و L929 به ترتیب در گستره ۱۵/۶ تا ۱۹۹/۱، ۵/۰۰ تا ۱۸۵/۲ و ۳۹/۸ تا ۱۶۸/۸، می باشند.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده سایتوتوکسیسیته ی بیش تری را برای کمپلکس ها در مقابل رده های سلولی MDA-MB-231 و Neuro-2a نشان داد. نتایج به دست آمده اثبات می کند کمپلکس سنتز شده هیچ گونه تأثیر سایتوتوکسیکی بر روی بر سلول های نرمال فیبروبلاست موش (L929) ندارد.

واژه های کلیدی: نیکل، مالتول، دیفریپرون، ۳-هیدروکسی فلاون، روش MTT، فلوسایتومتری، L929.

مقدمه

منطقه خاصی نیست، می تواند برای سلول های فراموش شده یا دور از دسترس مثل سلول های خونی یا لنف مورد استفاده قرار گیرد (۱).

به طور کلی بسیاری از داروهای شیمیایی که به منظور شیمی درمانی سرطان به کار برده می شوند، اغلب سبب تغییرهایی در فرایند تقسیم سلولی شده و بدین ترتیب، تکثیر و تمایز سلول سرطانی متوقف می شود. در سنتز این داروها علاوه بر آن که خاصیت سایتوتوکسیک آن ها در برابر سلول های سرطانی حائز اهمیت است، این ویژگی که کمترین اثرهای جانبی را نیز بر روی سلول های سالم فرد بیمار داشته باشد، از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از مؤثرترین داروهای شیمی درمانی، سیس پلاتین است اما ایراد اساسی آن سمیت این دارو است که به سلول های سالم فرد نیز صدمه می زند (۳۰). بنابراین دانشمندان سعی دارند تا داروهای جدیدتری با اثرهای سمی پایین را جایگزین این داروهای

شیمی درمانی یکی از انواع درمان های رایج در سرطان های مختلف است. شیمی درمانی به معنای درمان بیماری توسط مواد شیمیایی یا داروهای ضدسرطانی می باشد.

این روش درمان، از این نظر که می تواند در کل بدن جریان پیدا کند و به سلول های سرطانی دسترسی یابد، درمانی منحصر به فرد است و تنها درمانی است که چون محدود به

نویسنده مسئول :

گروه شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران ایران

پست الکترونیکی: saljooghi@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۴

سلولی LNCaP، PC3 (پروستات)، HCT 116 و CCD-18Co (کولون)، مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج مثبتی از اثر ضد تکثیری این کمپلکس بر رشد سلول های سرطانی در همه رده های سلولی مذکور گزارش شده است (۱۲).

بعضی از لیگاندها به عنوان داروی ضد سرطان به کار می روند. فعالیت ضد سرطانی برخی از آنها در نتیجه تشکیل کمپلکس با فلزها افزایش می یابد. مکانیسم دقیق فعالیت ضد سرطانی یک لیگاند به طور دقیق مشخص نیست. به طور کلی، فرض بر این است که با غیرفعال کردن فلزات کارسیوژنیک و یا آنزیم هایی که برای رشد سریع لازم هستند، عمل می کنند (۳۳).

یکی از این لیگاندها، ترکیب ۳-هیدروکسی فلاون می باشد که جزو خانواده فلاونوئیدها^۳ است. فلاونوئیدها ترکیب هایی با ساختار پایه ۲-فنیل کروم-۴-آن هستند که در طبیعت بیش تر به صورت ترکیب های پلی فنول با منشاء گیاهی یافت می شوند (۶). علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانی کمپلکس های فلاونوئیدی (۱۴)، کمپلکس های فلزی فلاونوئیدها، اغلب در برابر سلول های سرطانی فعالیت ضد تکثیری دارند (۳۵).

هیدروکسی پیرون ها، هتروسیکل هایی هستند که دارای یک گروه هیدروکسیلی در موقعیت اورتو نسبت به کتون بوده و بدین صورت دو گروه اکسیژن دهنده در مجاورت هم فراهم می آورند. مالتول که یکی از شناخته شده ترین هیدروکسی پیرون هاست، به عنوان یک افزونه خوراکی برای اضافه کردن طعم مالت به نان، کیک و بعضی نوشیدنی ها به کار می رود. تشکیل *in situ* کمپلکس Al^{3+} با مالتول، میزان حذف آلومینیوم از مغز را افزایش دهد. در واقع، خنثی بودن بار، ثبات در برابر هیدرولیز و انحلال پذیری بالای در محیط آبی، کمپلکس آلومینیوم-مالتول را به یک نوروتوکسین^۴ بالقوه تبدیل می کند (۹). بیس (مالتولاتو) اکسووانادیم (IV)، اولین عامل پایه وانادیمی افزایش دهنده انسولین است و نقطه شروع تولید کیلیت های وانادیل و وانادات جهت درمان دیابت نوع ۲ بود (۲۲). هم چنین خواص ضد سرطانی بعضی از کمپلکس های مالتول با Ru^{2+} و Ga^{3+} به تازگی گزارش شده است (۱۳، ۱۶).

سمی کنند. در سال های اخیر توجه زیادی به یافتن ترکیب های ضد سرطانی جدید حاوی یون های فلزی شده است (۲۴).

در سال های اخیر توجه محققین به طور روزافزون به شیمی کوئوردیناسیون کمپلکس های نیکل^۱ به عنوان الگوهایی برای جایگاه های فعال در آنزیم های حاوی نیکل جلب شده است (۱۸). تحقیق ها بر روی نقش نیکل در شیمی بیومعدنی در حال توسعه است. کمپلکس های نیکل (II) با لیگاندهای دهنده نیتروژنی و دهنده گوگردی نیز بسیار مورد توجه است زیرا آنزیم های هیدروژناز و کربن مونواکسید دی هیدروژناز دارای این کمپلکس های نیکل به عنوان جایگاه فعال خود هستند (۲۷). تأثیر ساختار و ترکیب کمپلکس های نیکل (II) با لیگاندهای شیف باز^۲، بر روی برهم کنش DNA/پروتئین و سایتوتوکسیتی گزارش شده است. سنتز، ساختار، اتصال به DNA و پروتئین، و فعالیت سایتوتوکسیک کمپلکس های نیکل (II) با لیگاندهای ۳،۳-دی آلکیل/آریل-۱-(۴،۲-دی کلروبنزوئیل) تیواوره مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۸). مطالعه های اتصال به DNA/پروتئین و تأثیر بر آپوپتوز میتوکندریایی رده سلولی سرطان ریه انسانی (A549) با کمپلکس های جدید نیکل گزارش شده است (۱۵). کارایی کمپلکس های نیکل با لیگاندهای تیوکرباکسامیدی N-(۲-متیل فنیل) پیریدین-۲-تیوکرباکسامید، N-(۴-متیل فنیل) پیریدین-۲-تیوکرباکسامید، N-(۶،۴،۲-تری متیل فنیل) پیریدین-۲-تیوکرباکسامید و N-(۲-کلرو فنیل) پیریدین-۲-تیوکرباکسامید، در ممانعت از رشد رده های سلولی سرطانی HeLa و NIH-3T3 در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفته و از آن میان، کمپلکس نیکل با N-(۶،۴،۲-تری متیل فنیل) پیریدین-۲-تیوکرباکسامید بیش ترین فعالیت ضد سرطانی را در مقایسه با سایرین نشان داده است (۱۸). ترکیب اورتو-نفتاکینون-تیوسمی کربازون با نیکل بر روی سرطان سینه انسانی (MCF7) مورد آزمایش قرار گرفته و مقدار $IC_{50}=2.25 \mu M$ گزارش شده است (۲). کمپلکس نیکل با N-متیل ایساتین-۳-پیکولینوئیل هیدرازون، مانع از تکثیر سلولی *in vitro* در رده های سلولی لوسمی TOM1 و NB4 شدند (۲۶). فعالیت سایتوتوکسیک کمپلکس نیکل با لیگاند تستوسترون تیوسمی کربازون بر روی رده های

³ Flavonoids

⁴ Neurotoxin

¹ Nickel

² Schiff base ligands

مواد و روش‌ها

حلال‌های متانول، اتانول، تری‌اتیل‌آمین و استون‌نیتریل، نمک‌های نیکل (II) نیترات شش آب و لیگاندهای ۳-هیدروکسی-۲-متیل-۴-پیرون (مالتول) و ۳-هیدروکسی-فلاون از شرکت مرک^۵ خریداری شدند. لیگاند ۳-هیدروکسی-۲-دی‌متیل-۴-پیریدینون (دی‌فیرپرون) از شرکت سیگما-آلدردیج^۶ خریداری شد. سیس‌پلاتین و PBS از شرکت سیگما‌آلدردیج، سرم جنین گاوی (FBS) و محیط کشت RPMI-1640 و DMEM^۷ از شرکت جیبکو^۸ (گیدرزبورگ^۹، آمریکا)، تریپسین از شرکت بوریونجر^{۱۰} (آلمان)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت بیوکروم ای جی^{۱۱} (برلین، آلمان) و MTT (دی‌متیل‌تيازول دی‌فنیل‌تترازولیموم‌برمید) از شرکت سیگما کو ال تی دی^{۱۲} خریداری شدند.

سنتز کمپلکس بیس‌مالتولات نیکل (II)، (۱)

۰/۶۶ میلی‌مول (۰/۰۸۳ گرم) لیگاند ۳-هیدروکسی-۲-متیل-۴-پیرون در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شد و سپس سود ۱ مولار قطره قطره به آن اضافه شد تا pH محلول به ۸/۹ برسد. محلول به دست آمده، ده دقیقه تحت شرایط هم‌خوردن قرار گرفت و سپس ۰/۳۰ میلی‌مول (۰/۰۸۷ گرم) نمک نیکل (II) نیترات شش آب به آن افزوده شد. با افزودن نمک، محلول بی‌رنگ به سبز روشن تغییر رنگ داد. محلول به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط هم‌خوردن گذاشته شد و در نتیجه آن، رسوب سبز رنگی به دست آمد. رسوب سه بار و هر بار با ۵ میلی‌لیتر آب سرد شستشو داده شد و به مدت سه روز در دسیکاتور قرار گرفت تا خشک شود (نقطه ذوب °C ۲۲۰-). سنتز کمپلکس مورد نظر با انجام طیف‌سنجی IR، اسپکترومتری جرمی و تجزیه عنصری تأیید شد.

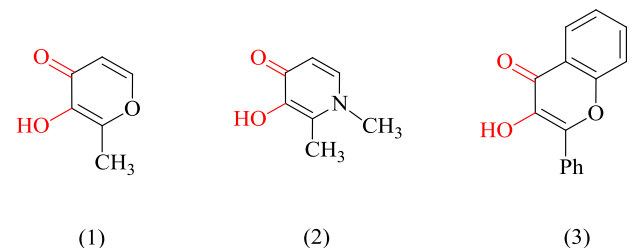
IR (cm⁻¹): ۱۲۸۷ - ۱۲۰۴ - ۱۰۳۴ - ۹۱۷ - ۸۴۳ - ۷۱۵

۳۴۶۵ - ۱۷۱۱ - ۱۵۷۰ - ۱۴۶۲

MS (m/z): ۳۰۸ [M⁺]

هیدروکسی‌پیریدینون‌ها، از لحاظ ساختاری بسیار مشابه هیدروکسی‌پیرون‌ها هستند با این تفاوت که در آن‌ها یک نیتروژن جایگزین اکسیژن حلقه پیرونی شده است. دی‌فیرپرون لیگاند دو دندان‌ای است که با آهن سه ظرفیتی تشکیل کمپلکس داده و مانع از شرکت آهن در واکنش‌های بیوشیمیایی می‌شود. این دارو به صورت خوراکی مصرف می‌شود و گزارش‌هایی از خاصیت کیلیت‌شوندگی آن در درمان تالاسمی ماژور، آلزایمر و پارکینسون و نیز در درمان سرطان شده است (۴، ۵، ۱۱، ۲۳، ۲۵، ۳۱).

مالتول، دی‌فیرپرون و ۳-هیدروکسی‌فلاون از لحاظ دارا بودن گروه‌های دهنده اکسیژنی هیدروکسیلی و کتونی، دارای مشابهت ساختمانی هستند (شکل ۱).



در این پروژه، با توجه به اثرهای مشاهده شده در لیگاندهای ۳-هیدروکسی-۲-متیل-۴-پیرون (مالتول)، ۳-هیدروکسی-۲-دی‌متیل-۴-پیریدینون (دی‌فیرپرون) و ۳-هیدروکسی-فلاون و ویژگی‌های ضدسرطانی ترکیب‌های نیکل، کمپلکس‌های جدیدی از این فلز با لیگاندهای ذکر شده، سنتز و با آنالیزهای مختلف شناسایی شدند. پس از سنتز، خاصیت ضد-تکثیری و القاء آپوپتوز آن‌ها، با اثر بر روی رده‌های سلولی HeLa (کارسینومای تخمدان انسانی)، MCF-7 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی مثبت)، رده سلولی MDA-MB-231 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی منفی)، NALM-6 (سرطان سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک حاد)، Neuro-2a (نوروبلاستوما موشی) و L929 (رده سلولی فیروبلاست موشی، سلول نرمال) با آزمون سمیت سلولی (MTT assay) و فلوسایتومتری بررسی گردید. هم‌چنین، به منظور مقایسه خاصیت سائتوتوکسیک این ترکیب با داروهای رایج در شیمی‌درمانی، خاصیت سائتوتوکسیک داروی سیس-پلاتین نیز به‌عنوان مرجع، مورد بررسی قرار گرفت.

⁵ Merk

⁶ Sigma Aldrich

⁷ Dulbecco's modified Eagle's medium

⁸ GIBCO

⁹ Gaithersburg, USA

¹⁰ Boehringer

¹¹ Biochrom AG

¹² Sigma Co Ltd

CHN: Anal. Calcd: C: ۳۹/۸۲; H: ۵/۹۵; N: ۶/۷۵ ,
Found: C: ۳۹/۳۷; H: ۶/۶۱; N: ۶/۵۶

سنتز کمپلکس بیس (۳-هیدروکسی فلاونات) نیکل (II)،
(۳)

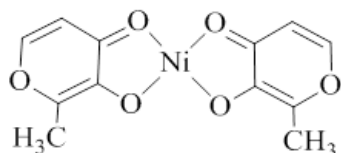
۰/۵۰ میلی مول (۰/۱۴۵ گرم) نمک نیکل (II) نیترات شش آب به ۵ میلی لیتر اتانول حل شد. محلول به دست آمده به محلول ۱ میلی مول لیگاند ۳-هیدروکسی فلاون حل شده در ۱۰ میلی لیتر اتانول افزوده شد. بعد از افزودن سه قطره تری اتیل آمین به محلول نمک و لیگاند، ترکیب بی رنگ آن به زرد تیره تغییر رنگ داد. محلول را به مدت ۱۵ دقیقه تحت شرایط هم خوردن گذاشته شد. رسوب سبز ماشی رنگ به دست آمد (نقطه ذوب ۱۲۰-۱۲۲ °C). سنتز کمپلکس مورد نظر با انجام طیفسنجی IR، اسپکترومتری جرمی و تجزیه عنصری تأیید شد.

IR (cm⁻¹): ۱۲۶۲ - ۱۲۰۲ - ۱۰۷۳ - ۹۱۹ - ۸۴۱ - ۷۰۴
۳۳۷۸ - ۱۶۳۲ - ۱۳۸۸

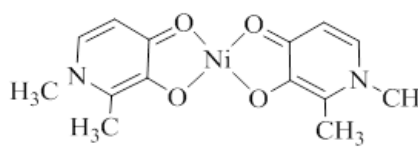
MS (m/z): ۵۴۳ [M⁺]

CHN: Anal. Calcd: C: ۶۳/۶۲; H: ۳/۷۳, Found: C:
۶۳/۰۸; H: ۴/۲۴

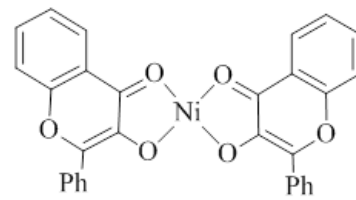
ساختار کمپلکس های ۱-۳ را در شکل ۲، آورده شده است.



1



2



3

شکل ۲: ساختار شیمیایی کمپلکس مالتول-نیکل، (۱)، دیفریپرون-نیکل، (۲) و ۳-هیدروکسی فلاون-نیکل، (۳)

فلوسایتومتری بررسی گردید. هم چنین به منظور مقایسه خاصیت سایتوتوکسیک این کمپلکس با داروهای رایج در شیمی درمانی، خاصیت سایتوتوکسیک داروی سیس پلاتین نیز به عنوان مرجع، مورد بررسی گرفت.

بررسی اثرهای سمیت سلولی به روش MTT

برای کنترل وضعیت سلول ها در محیط کشت، میزان بقاء^{۱۳}، و هم چنین بررسی وضعیت سلول ها بعد از تیمارهای مختلف دارویی از روش های مختلفی استفاده می شود که یکی از این روش ها تست MTT می باشد.

CHN: Anal. Calcd: C: ۳۳/۵۶; H: ۳/۸۶, Found: C:
۳۲/۷۸; H: ۴/۰۰

سنتز کمپلکس بیس (۳-هیدروکسی-۱،۲-دی متیل-۴-پیریدینوات) نیکل (II)، (۲)

۰/۷۹ میلی مول (۰/۱۱۰ گرم) لیگاند ۳-هیدروکسی-۲-متیل-۴-پیرون در ۱۰ میلی لیتر آب حل شد و سپس سود ۱ مولار قطره قطره به آن افزوده شد تا pH محلول به ۸/۹ برسد. محلول به دست آمده، ده دقیقه تحت شرایط هم خوردن قرار گرفت و سپس ۰/۳۶ میلی مول (۰/۱۰۴ گرم) نمک نیکل (II) نیترات شش آب به آن افزوده شد. با افزودن نمک، محلول بی رنگ به سبز روشن تغییر رنگ داد. محلول به دست آمده، به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط هم خوردن قرار گرفت و در نتیجه آن، رسوب سبز رنگی به دست آمد. رسوب سه بار و هر بار با ۵ میلی لیتر آب سرد شستشو داده شد و به مدت سه روز در دسیکاتور قرار گرفت تا خشک شود (نقطه ذوب ۲۳۰-۲۲۸ °C). کمپلکس مورد نظر با انجام طیفسنجی IR، اسپکترومتری جرمی و تجزیه عنصری تأیید شد.

IR (cm⁻¹): ۱۵۴۷- ۱۴۹۷- ۱۳۵۸- ۱۲۹۰- ۱۱۲۱- ۱۰۲۹-
۱۷۰۶- ۱۶۰۲ ۸۱۸ - ۷۶۳

MS (m/z): ۳۳۳ [M⁺]

رده های سلولی

در این مطالعه، کمپلکس هایی از نیکل با لیگاندهای یاد شده سنتز شدند. پس از سنتز، خاصیت ضدسرطانی و سایتوتوکسیک آن ها بر روی رده های سلولی HeLa (کارسینوما تخمدان انسانی)، MCF-7 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی مثبت)، رده سلولی MDA-MB-231 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی منفی)، NALM-6 (سرطان سلول های لوسمی لنفوسیتیک حاد)، Neuro-2a (نوروبلاستوما موشی) و L929 (رده سلولی فیروبلاست موشی، سلول نرمال) با آزمون سمیت سلولی (MTT assay) و

¹³ Viability

چاهک، از داروی کنترل مثبت سیس پلاتین برای مقایسه با کمپلکس مورد مطالعه، استفاده شد. هر رقت در سه چاهک از پلیت سنجش گردید و برای هر رقت، سه بار تکرار در نظر گرفته شد.

ارزبایی آپوپتوز برای کمپلکس بوسیله فلوسایتومتری

به منظور این که مطالعه شود که به چه شکلی کمپلکس مورد نظر، مرگ سلولی (نکروز^{۱۵} یا آپوپتوز^{۱۶}) ایجاد می کند، مطالعه های فلوسایتومتری بر روی این ترکیب و سیس پلاتین به عنوان مرجع صورت می پذیرد (۳۴، ۱۰، ۸). آپوپتوز یک شکل منفرد از مرگ سلولی است که در اغلب بافت ها، تعداد سلول ها را در طی نمو و نیز در انواع گسترده ای از شرایط پاتولوژیک و نرمال، کنترل می نماید. برای آپوپتوز، اصطلاح های دیگری نیز به کار می رود که عبارتند از: مرگ سلولی کنترل شده، مرگ سلولی فیزیولوژیک، مرگ سلولی بیولوژیک و مرگ سلولی برنامه ریزی شده. از آنجایی که در مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین^{۱۷} (که یک فسفولیپید غشایی است و باعث انعطاف پذیری غشای سلول ها می شود)، از سطح داخلی غشاء پلاسمایی به سطح خارجی آن منتقل می شود و در آنجا برای رساندن پیام مرگ به سلول های مجاور فاگوسیت های عملکردی جهت بلعیدن سلول، عمل می نماید (۲۱). در روشی جدید برای نشان دادن سلول های آپوپتوزی، Annexin V که عضوی از خانواده Annexin است را به کار می برند (۳۲). در واقع Annexin با واسطه Ca^{2+} می تواند به فسفو لیپید متصل شود و برای نشان دادن سلول های آپوپتوزی در محیط های کشت و یا برش های بافتی که توسط FITC و Annexin V فیکس شده اند، به کار رود. تمایز بین سلول های آپوپتوتیک و نکروتیک می تواند به وسیله رنگ آمیزی همزمان با پروپیدیم دید (PI) انجام گیرد. بنابراین آنکسین FITC-V (AnnexinV-FITC) به عنوان یک نشانگر در معرض فسفاتیدیل سرین و PI به عنوان یک نشانگر برای سلول های مرده، مورد استفاده قرار می گیرد. بر این اساس و به منظور تعیین سلول های آپوپتوزی و نکروز در یک جمعیت سلولی تیمار شده با کمپلکس مورد مطالعه، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ آنکسین FITC-V و پروپیدیم دید (PI) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و در پی تقسیم بندی یک منحنی دوعبده آنکسین FITC-V در برابر پروپیدیم دید (PI) به چهار ناحیه ی Q1 تا Q4، صورت گرفت.

کمپلکس های تهیه شده در این مطالعه، برای فعالیت ضدتوموری در برابر رده های سلولی MDA-MCF-7، HeLa، Neuro-2a، NALM-6، MB-231 و L929 بررسی و از سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع برای مقایسه استفاده شد. درصد میزان بقاء (زنده ماندن سلول ها) با استفاده از یک روش رنگ-سنجی بر مبنای نمک تترازولیم MTT مورد بررسی قرار گرفت. MTT که یک نمک تترازولیوم زردرنگ است توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول های زنده احیاء شده و به ترکیب بنفش رنگ فورمازان که کریستالی و نامحلول می باشد، تبدیل می گردد. سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه ای (چاهک) و به تعداد $5 \times 10^4 - 2$ سلول از هر رده سلولی به ازای هر چاهک در $100 \mu L$ از محیط کشت، کشت داده شدند و برای چسبندگی مطلوب به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از حذف دقیق محیط کشت، $100 \mu L$ از محیط کشت تازه، اضافه شده و انکوباسیون در $37^\circ C$ درجه سانتی گراد و $5\% CO_2$ به مدت ۷۲-۲۴ ساعت انجام گرفت. سپس هر یک از کمپلکس های سنتز شده، ابتدا در DMSO حل و سپس در محیط کشت، رقیق شده و در غلظت های نهایی $200 \mu M - 20 nM$ به سلول ها اضافه شد. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون ها کمتر از 1% بود. سیس پلاتین ابتدا در محلول نمکی حل شده و سپس در همان غلظت استفاده شده برای کمپلکس، به سلول ها اضافه شد. سپس، انکوباسیون در $37^\circ C$ درجه سانتی گراد و $5\% CO_2$ به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. در پایان انکوباسیون، مقدار $20 \mu L$ از محلول MTT ($5 mg/ml$ در بافر بی رنگ PBS) به چاهک ها اضافه شد و پس از ۴-۳ ساعت انکوباسیون، محتوای چاهک ها (محیط کشت) تخلیه شد. سپس در این مرحله، $100 \mu L$ DMSO به عنوان حلال کریستال های بنفش رنگ فورمازان که در سیتوپلاسم سلول ها ایجاد شده اند، به هر چاهک افزوده شد. پلیت، به مدت ۶ دقیقه با سرعت 400 دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا کریستال های فورمازان تشکیل شده، به طور کامل درون DMSO حل شوند. سپس شدت رنگ ها، توسط دستگاه الیزا ریدر^{۱۴} در طول موج $570 nm$ خوانده شد. بعد از محاسبات مربوطه، IC_{50} نمونه ها برای زمان مورد نظر تعیین شد.

از محیط کشت فاقد سلول، به عنوان بلانک دستگاه الیزا ریدر و از محیط کشت به همراه سلول و بدون دارو، به عنوان کنترل سلول زنده استفاده شد. لذا سه چاهک شامل سلول و محیط کشت کامل، به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در سه

¹⁵ Necrosis

¹⁶ Apoptosis

¹⁷ Phosphatidylserine: PS

¹⁴ ELISA Reader

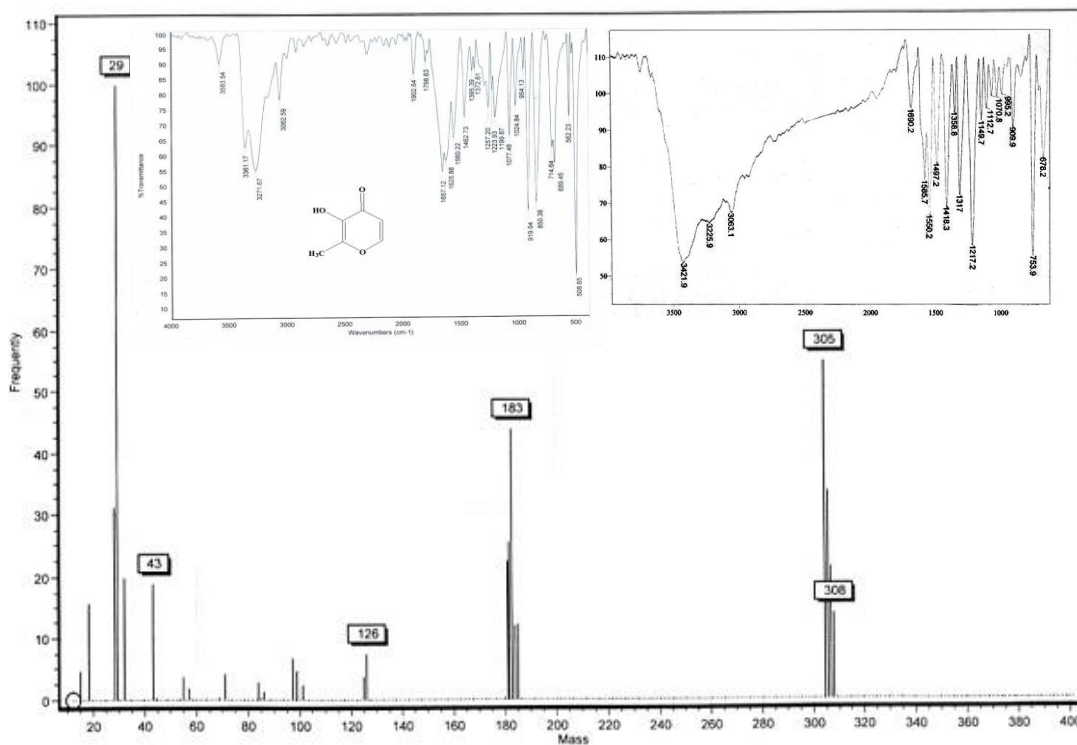
برهم کنش بین فلز و لیگاند می باشد. این نتایج نشان می دهند که لیگاند ۳-هیدوروکسی فلاون در کمپلکس سنتز شده وجود دارد. در طیف جرم این کمپلکس (پیوست ۳، شکل ۳)، پیک یون مولکولی در m/z ۵۳۴ ظاهر شده است که تأییدی بر سنتز کمپلکس مورد نظر است. جرم-های ۲۹۱ و ۵۷، به ترتیب به جدا شدن یک و دو لیگاند از کمپلکس مورد نظر اشاره دارند. هم چنین، داده های تجزیه عنصری که تطابق خوبی در مقادیر تجربی و تئوری آنها وجود دارد، شاهد دیگری بر تأیید سنتز کمپلکس ۳ می باشد.

تعداد نسبی سلول های تیمار شده (سلول در حضور دارو) و تیمار نشده (سلول در عدم حضور دارو) در حضور غلظت های متفاوت از کمپلکس مورد نظر پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون به روش رنگ سنجی MTT سنجش شد. با شکست حلقه تترازولیم توسط آنزیم های دهیدروژناز، MTT زرد رنگ محلول به فورمازان نامحلول بنفش تبدیل می شود. در واقع آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده و فعال، قادر به تبدیل MTT به فورمازان است ولی سلول های مرده از این نظر ناتوان هستند. نتایج سمیت سلولی توسط کمیت IC_{50} برای کمپلکس مورد نظر بر روی پنج رده ی سلولی در جدول (۱) آورده شده است.

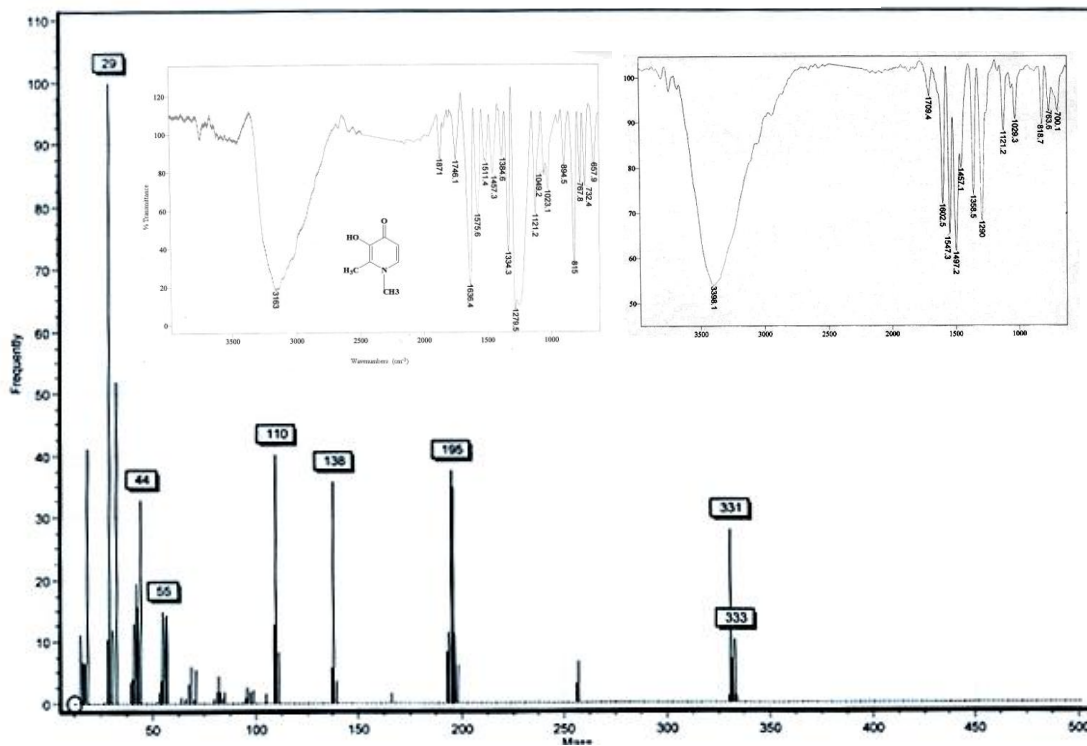
هم چنین به منظور مطالعه چگونگی مرگ سلولی ایجاد شده توسط کمپلکس های سنتز شده، مرگ سلولی (نکروز یا آپوپتوز) ایجاد می کنند، مطالعه های فلوسایتمتری بر روی این ترکیب و سیس پلاتین به عنوان مرجع انجام گرفت. نتایج فلوسایتمتری جدول ۲، آورده شده است.

۱۵۷۵ و cm^{-1} ۱۳۳۴ را می توان به ترتیب به ارتعاشات کششی $C=C$ حلقه و $C-N$ نسبت داد. طیف IR این کمپلکس در نشان داده شده است. با مقایسه طیف IR لیگاند ۳-هیدوروکسی-۱، ۲-دی متیل-۴-پیریدینون با طیف IR کمپلکس سنتز شده، می توان گفت که باند ارتعاشی cm^{-1} ۱۶۳۶ به cm^{-1} ۱۶۰۲ و cm^{-1} ۱۵۷۵ به cm^{-1} ۱۵۴۷ تغییر یافته اند. به عبارت دیگر، پیوندهای $C=O$ گروه کربونیل و $C=C$ حلقه ضعیف تر شده اند (جابجایی قرمز) که نشان دهنده برهم کنش بین فلز و لیگاند می باشد. نوار جذبی مربوط به $O-H$ کششی، در باند cm^{-1} ۳۳۹۸ ظاهر شده و باند ارتعاشی مربوط به $C-N$ از cm^{-1} ۱۳۳۴ به cm^{-1} ۱۳۵۸ تغییر یافته است. این نتایج نشان می دهند که لیگاند ۳-هیدوروکسی-۱، ۲-دی متیل-۴-پیریدینون در کمپلکس سنتز شده وجود دارد. در طیف جرم این کمپلکس پیک یون مولکولی در m/z ۳۳۳ ظاهر شده است که تأییدی بر سنتز کمپلکس مورد نظر است. جرم-های ۹۵ و ۵۵، به ترتیب به جدا شدن یک و دو لیگاند از کمپلکس مورد نظر اشاره دارند. هم چنین، داده های تجزیه عنصری که تطابق خوبی در مقادیر تجربی و تئوری آنها وجود دارد، شاهد دیگری بر تأیید سنتز کمپلکس ۲ می باشد (شکل ۴).

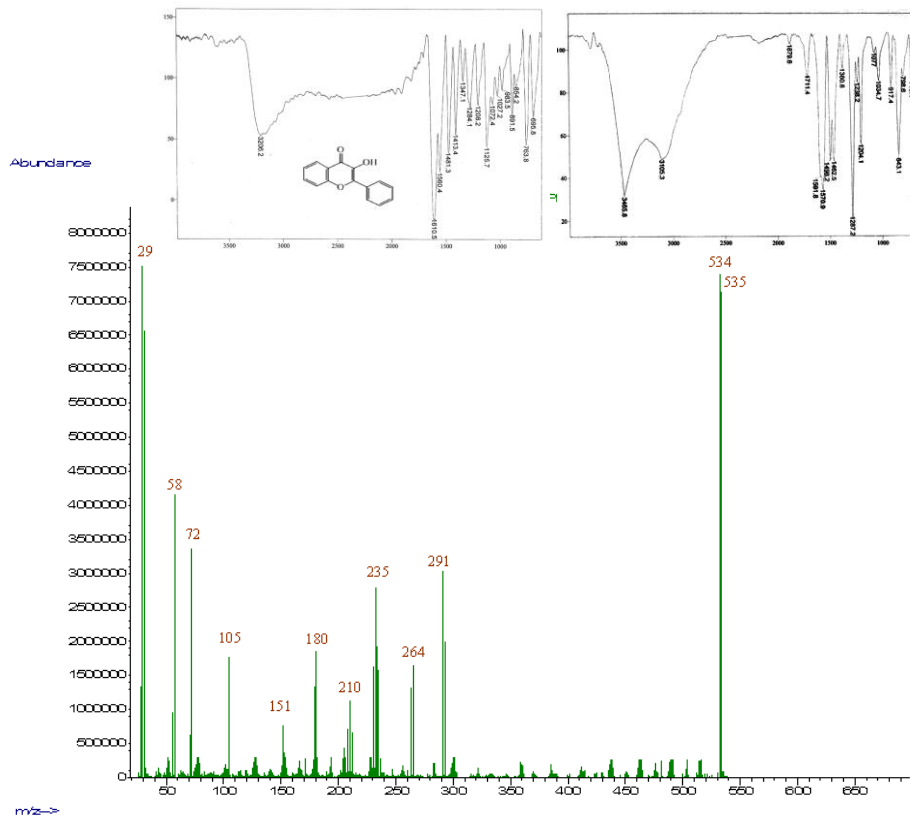
در طیف IR لیگاند ۳-هیدوروکسی فلاون چند نوار جذبی مشخص در اعداد موجی cm^{-1} ۳۲۰۶، cm^{-1} ۱۶۱۰ و cm^{-1} ۱۵۶۰ مشهود است. نوار جذبی ظاهر شده در باند cm^{-1} ۳۲۰۶ مربوط به ارتعاشات کششی $O-H$ است و نوار جذبی مربوط به گروه کربونیل ($C=O$) در باند cm^{-1} ۱۶۱۰ مشاهده می شود. هم چنین، باند ظاهر شده در cm^{-1} ۱۵۶۰ را می توان به ارتعاشات کششی $C=C$ حلقه نسبت داد. طیف IR این کمپلکس شکل ۵ نشان داده شده است. با مقایسه طیف IR لیگاند ۳-هیدوروکسی فلاون با طیف IR کمپلکس سنتز شده، می توان گفت که باند ارتعاشی cm^{-1} ۱۶۱۰ به cm^{-1} ۱۵۸۵ و باند ارتعاشی cm^{-1} ۱۵۶۰ به cm^{-1} ۱۵۵۰ تغییر یافته اند. به عبارت دیگر، پیوندهای $C=O$ گروه کربونیل و $C=C$ حلقه ضعیف تر شده اند (جابجایی قرمز)، که نشان دهنده



شکل ۳: طیف‌سنجی‌های FT-IR و اسپکترومتری جرمی مالتول و کمپلکس (۱).



شکل ۴: طیف‌سنجی‌های FT-IR و اسپکترومتری جرمی مالتول و کمپلکس (۲).



شکل ۵: طیف‌سنجی‌های FT-IR و اسپکترومتری جرمی مالتول و کمپلکس (۳).

جدول ۱: فعالیت ضدسرطانی کمپلکس‌های (۱) تا (۳) در مقابل رده‌های سلولی HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, NALM-6, Neuro-2a و L929 پس از ۷۲ ساعت تیمار پیوسته

رده‌ی سلولی	IC ₅₀ ± SD (μM) ^{الف}			
	کمپلکس (۱)	کمپلکس (۲)	کمپلکس (۳)	سیس‌پلاتین
HeLa	۱۵/۶ ± ۳/۸۳	۱۰/۳ ± ۲/۲۵	۳۹/۸ ± ۴/۷۸	۰/۴۵ ± ۰/۱۲
MCF-7	۲۱/۲ ± ۴/۴۵	۱۷/۶ ± ۳/۱۸	۶۷/۲ ± ۷/۰۳	۶/۵۰ ± ۲/۱۱
MDA-MB-231	۱۹/۳ ± ۴/۱۵	۵/۰۰ ± ۲/۲۳	۷۲/۱ ± ۶/۸۵	۲۴/۶ ± ۴/۶۹
NALM-6	۹۳/۱ ± ۹/۷۷	۶۵/۹ ± ۸/۵۴	۹۹/۳ ± ۹/۱۲	۲۴/۰ ± ۲/۹۳
Neuro-2a	۱۷۶/۴ ± ۱۶/۳	۱۵۳/۵ ± ۱۶/۷	۵۳/۸ ± ۶/۴۳	۱۶۵/۱ ± ۱۵/۹
L929	۱۹۹/۱ ± ۱۷/۵	۱۸۵/۲ ± ۱۷/۱	۱۶۸/۸ ± ۱۵/۵	۰/۷ ± ۰/۲

^{الف} غلظتی از کمپلکس که بازدارنده‌ی رشد سلول‌ها تا ۵۰٪ باشد. هر غلظت در سه چاهک از پلیت‌سنجش‌گرید و برای هر غلظت، سه بار تکرار در نظر گرفته شد. IC₅₀ > ۱۰۰ μM، غیر فعال در نظر گرفته شد.

جدول ۲: درصد مرگ سلولی مشاهده شده به وسیله ی آزمون فلوسایتومتری بر روی رده ی سلولی MDA-MB-231 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی منفی)، کمپلکس های ۱ و ۲ و NALM-6 (سرطان سلول های لوسمی لنفوسیتیک حاد)، کمپلکس ۳، پس از ۲۴ ساعت تیمار پیوسته

سلول های نکروتیک %	سلول های آپوپتیک-نکروتیک %	سلول های آپوپتیک %	سلول های زنده %	تیمار
۱/۰	۱۷/۰	۶/۵	۷۵/۵	کنترل
۷/۵	۳۵/۳	۲۹/۹	۲۷/۳	سیس پلاتین
۷/۰	۳۶/۴	۳۴/۱	۲۲/۵	کمپلکس (۱)
۲/۹	۴۸/۳	۳۸/۵	۱۰/۳	کمپلکس (۲)
۴/۵	۳۴/۰	۳۷/۴	۲۴/۱	کمپلکس (۳)

بحث

شیمی بیومعدنی حوزه رو به گسترشی است که کاربردهای بی شماری در پزشکی دارد. علم داروسازی امروزه فقط در انحصار شیمی آلی نیست و شیمی معدنی پزشکی، گزینه های دارویی فراوانی را به حوزه ی داروسازی ارائه کرده است که با مکانیسم های کاملا متفاوتی نیز اثر می کنند. موفقیت داروی سیس پلاتین، نقطه آغازین پیشرفت و گسترش این حوزه از علم شیمی معدنی بود. این دارو به همراه سایر کمپلکس های پلاتین که سمیت کم تر و امکان استفاده ی خوراکی بیش تری دارند، پر فروش ترین داروهای ضد سرطان بوده اند.

مالتول، دیفریپرون و ۳-هیدروکسی فلاون از لحاظ دارا بودن گروه های دهنده اکسیژنی هیدروکسیلی و کتونی، دارای مشابهت ساختمانی هستند. هم چنین این لیگاندها دارای فعالیت های بیولوژیکی گزارش شده می باشند. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی اثرهای ضد تکثیری و القاء آپوپتوز کمپلکس های نیکل با این لیگاندها می باشد. درصد میزان بقاء (زنده ماندن سلول ها) با استفاده از یک روش رنگ سنجی بر مبنای نمک تترازولیم MTT مورد بررسی قرار گرفت. شدت رنگ ایجاد شده در روش MTT با سلول هایی دارای میتوکندری فعال می باشد، متناسب است. در واقع این روش برای تعیین میزان تکثیر و بقای سلول ها بعد از قرار گرفتن در معرض مواد سیتوتوکسیک مورد استفاده قرار می گیرد. به طور کلی بسیاری از داروهای شیمیایی که به منظور شیمی درمانی سرطان به کار برده می شوند، اغلب سبب

تغییرهایی در فرایند تقسیم سلولی شده و بدین ترتیب، تکثیر و تمایز سلول سرطانی متوقف می شود.

نیکل عنصری ضروری در انواعی از آنزیم ها مانند اوره آز، کربن-مونوکسید دهیدروژناز و هیدروژناز می باشد (۷). نتایج اخیر، برخی از ویژگی های این عنصر گروه پلاتین را در مطالعه هایی با پتانسیل ضدتوموری نشان می دهند. برای مثال سائیتوکسیسیته کمپلکس های نیکل شامل لیگاندهای تیوسمی کاربازین نفتوکوئینون پایه (NQTS)^{۱۸}، بر روی رده سلول سرطانی سینه انسانی MCF-7، تست شده اند و با لیگاند آزاد، سایر نفتوکوئینون ها و داروی تجاری اتوپساید مقایسه شد (۷). طبق نتایج به دست آمده، کمپلکس Ni-NQTS، بیش ترین خاصیت ضدتوموری را با IC₅₀ برابر با ۲/۲ دارا است. مطالعه های مکانیسمی ترکیب مورد نظر، بازدارندگی توپوایزومراز (II) را نشان می دهد (۷). مطالعه دیگری از کمپلکس های نیکل با سمی کاربازون ها (شکل ۶)، حتی تأثیرهای بازدارندگی بیش تری را در مقابل رده سلول سرطانی سینه انسانی MCF-7، دارا است. آن ها مقادیر IC₅₀ در گستره ی ۵-۲ μM را نشان می دهند از سویی میزان اثرهای جانبی آن ها نیز کم تر از تیوسمی کاربازون ها است (۳). کمپلکس های محلول در آب بر پایه باز شیف سالن، مانند ۳، ۳' - [۱، ۲- پروپیلن دی ایل بیس (نیترویلومتیلیدین)] بیس [۲-هیدروکسیل] نیز خاصیت ضدسرطانی از خود نشان داده اند (۲۰). تست های دارویی نشان می دهد که کمپلکس-

¹⁸ Naphtoquinone-based thiosemicarbazone ligands (NQTS)

با توجه به این که در این تحقیق از رده سلولی L929 به عنوان سلول طبیعی و شاهد استفاده شد، نتایج به دست آمده در تست کمی MTT به صورت *in vitro* نشان می دهند کمپلکس سنتز شده هیچ اثر ساینوتوکسیکی بر روی این سلول های نرمال ندارند. بایستی تأکید شود که این یافته ها جهت به کارگیری به صورت بالینی نیز باید به صورت *in vivo* به اثبات رسد.

به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده (نکروز یا آپوپتوز) توسط کمپلکس مورد نظر، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. تشخیص فسفاتیدیل سرین در سطح سلول ها به وسیله AnnexinV-FITC به عنوان یک مارکر در شناسایی سلول های آپوپتوز شده از سایر سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد. در واقع در شکل ۳، این امکان وجود دارد که جمعیت سلول ها را برای چهار حالت ممکن (یک چهارم ها: quadrant) به دست آورده شد: جمعیت سلول های زنده (یعنی، سلول هایی که کنترل های منفی برای آنکسین V (Annexin V) و پروپیدیوم یدید (PI) ارائه می دهند؛ یک چهارم چپ، پایین)، جمعیت سلول هایی که متحمل آپوپتوز می شوند (PI منفی و Annexin V مثبت؛ یک چهارم راست، پایین)، سلول های درگیر در آپوپتوز تأخیری^{۱۹} یا نکروز، مثبت برای هر دو رنگ؛ یک چهارم راست، بالا)، سلول های نکروتیک که به صورت مکانیکی تخریب شده اند فقط از نظر PI مثبت هستند؛ یک چهارم چپ، بالا). با توجه به نتایج جدول ۲، کمپلکس های (۱) تا (۳)، به ترتیب جمعیت زیادی از سلول ها را در نواحی آپوپتوز (۷۰/۵٪) و کمابیش ۱/۱ برابر بیش تر از سیس پلاتین (۶۵/۲٪)، (۸۶/۸٪) و کمابیش ۱/۴ برابر بیش تر از سیس پلاتین (۶۵/۲٪) و (۷۱/۴٪) و ۱/۱ برابر بیش تر از سیس پلاتین (۶۵/۲٪)، در غلظت یکسان نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که کمپلکس های (۱) و (۲) می تواند منجر به آپوپتوز سلول های سرطانی MDA-MB-231 و کمپلکس (۳) منجر به آپوپتوز سلول های سرطانی Neuro-2a شود. اما خاصیت پروآپوپتوز، نیاز به بررسی های بیش تری برای درک بهتر مکانیسم دقیق عمل این کمپلکس ها دارد.

در بررسی مکانیسم مرگ و میر سلولی، علاوه بر فلوسایتومتری، میزان مرگ سلولی بر اساس دستورالعمل کیت تانل (Mannheim Nirp., Indianapolis IN Boehringer) در *in situ* آن گونه که توسط نارلا، ژو و همکاران توصیف گردیده است، بررسی شد. اساس این روش بر مبنای اتصال اختصاصی

های نیکل شامل لیگاندهای تتراآزاماکروسیکل با چهار گروه آویزان خنثی سیانواتیل $[Ni(L)(NO_3)]NO_3$ که L، ۱، ۴، ۷، ۱۰-تتراکیس (۲-سیانواتیل)، ۱، ۴، ۷، ۱۰-تترا آزاسیکلودودکان است، در مقابل سلول های توموری HL-60 و BEL-7404 در محیط *in vitro*، حتی در غلظت 10^{-8} مول بر لیتر، خاصیت ضد توموری نشان می دهند (۱۷). در مطالعه های اخیر، لیگاندهای L- سالیسیلویل، O-N'- هیدروکسی تیوبنزوهیدرازید و N- نیکوتینویل O-N'- هیدروکسی تیوبنزوهیدرازید (۲۹) از کمپلکس های آکوا نیکل (II)، گزارش شده اند و مشاهده شده است که در محیط *in vitro* مانع از رشد سلول های سرطانی می شوند. موفقیت کمپلکس های پالادیم و پلاتین در ساخت داروهای ضدسرطان پایه فلزی و از سویی گران بودن و اثرهای جانبی این ترکیب ها، راه را برای بررسی عنصر دیگر خانواده گروه پلاتین باز کرده است هر چند که تاکنون مطالعه های صورت گرفته اند و در حال انجام است.

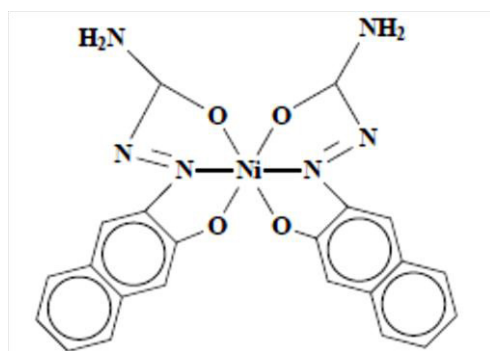
لذا خاصیت ضدسرطانی کمپلکس های بیس مالتولات نیکل (II)، (۱)، بیس (۳-هیدروکسی-۱، ۲-دی متیل-۴-پیری-دینونات) نیکل (II)، (۲)، و بیس (۳-هیدروکسی فلاونات) نیکل (II)، (۳) در برابر پنج رده سلول HeLa، MCF-7، MDA-MB-231، NALM-6، Neuro-2a و L929 بررسی و از سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع برای مقایسه استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که مقادیر IC_{50} ، در گستره ۱۵/۶ تا ۱۹۹/۱ برای کمپلکس (۱)، ۵/۰۰ تا ۱۸۵/۲ برای کمپلکس (۲) و ۳۹/۸ تا ۱۶۸/۸ برای کمپلکس (۳)، تغییر می کنند در حالی که مقادیر این پارامتر در سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع، بین ۰/۴۵ تا $165/1 \mu M$ تغییر می کنند. نتایج به دست آمده از میزان بقاء سلول های سرطانی MDA-MB-231 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی منفی) نشان می دهد که کمپلکس (۱) و (۲) در گستره غلظتی $20 \mu M - 20 nM$ ، ۲۰ پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون تأثیر قابل ملاحظه ای بر میزان مرگ و میر این سلول های سرطانی دارد. هم چنین نتایج به دست آمده از میزان بقاء سلول های سرطانی NALM-6 (سرطان سلول های لوسمی لنفوسیتیک حاد) نشان می دهد که در همین گستره غلظتی از کمپلکس (۳) پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون تأثیر قابل ملاحظه ای بر میزان مرگ و میر این سلول های سرطانی دارد.

¹⁹ late apoptosis

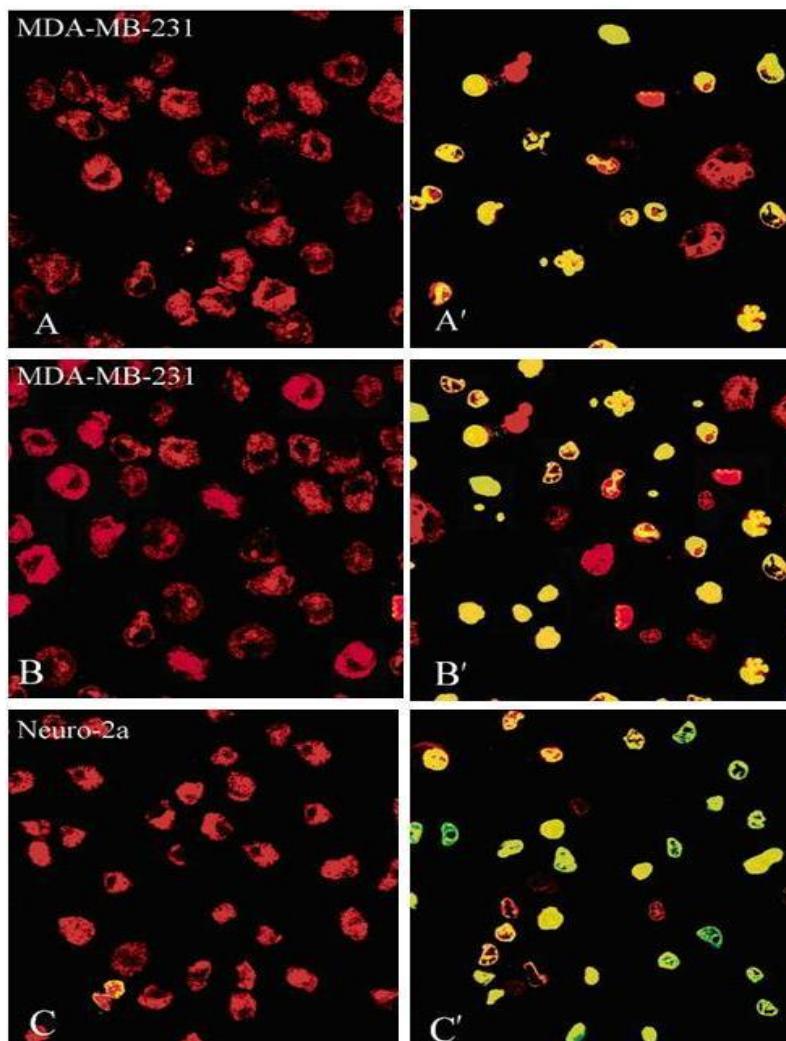
۷ (A) و (A') که برای رده سلول سرطانی MDA-MB-231 نمایش داده شده است مشاهده می شود،

سلول سرطانی MDA-MB-231 تیمارشده توسط کمپلکس (۱) با اتصال به dUTP-FITC (فلورسانس سبز) و پروپیدیوم دیدم متمایزکننده (فلورسانس قرمز)، تعداد زیادی از سلول-های آپوپتیک با هسته زرد (افزوده شده بر روی فلورسانس سبز و قرمز) را پس از ۲۴ ساعت تیمار با کمپلکس مورد نظر نمایش دادند. نتایج مشابهی برای کمپلکس (۲) در شکل ۷ (B) و (B') برای رده سلول سرطانی MDA-MB-231 و برای کمپلکس (۳) در شکل ۷ (C) و (C') که برای رده سلول سرطانی Neuro-2a حاصل آمد.

داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی (TdT) به انتهای 3'-OH موجود در DNA قطعه شده است. این آنزیم سبب قراردادن نوکلئوتیدهای نشاندار (Biotin-dUTP, DIG-dUTP,) در محل شکست DNA می شوند. با استفاده از آویدین نشاندار با پراکسیداز که به بیوتین متصل می شود می توان سلول های نشاندار را با میکروسکوپ نوری یا فلورسانس مشاهده و بررسی کرد. سلول مورد نظر (MDA-MB-231) با کمپلکس (۱) در ۰/۳٪ DMSO یا نمونه هایی از پلاسما با رقت ۱:۱۶ از کمپلکس مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس ثابت گردید. سلول ها به اسلایدهایی منتقل شدند و به وسیله میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال، مشاهده شدند. همان گونه که در شکل



شکل ۶: ساختار کمپلکس نیکل - سمی کاربازون دارای خاصیت ضدتوموری.



شکل ۷: کمپلکس (۱)، آپوپتوز را در سلول‌های سرطان سینه انسانی (MDA-MB-231) القا می‌کند. سلول‌های سرطان سینه انسانی (MDA-MB-231) با ۱۰ mM از کمپلکس مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و فیکس شدند. تصاویر ناشی از تخریب DNA با کمک تکنیک TUNEL و با نشاندار کردن dUTP-تهیه شده شد. فلورسانس قرمز، هسته‌ی رنژگ‌آمیزی شده با پروپییدیوم دیدیم می‌باشد. فلورسانس سبز و زرد، هسته‌ی آپوپتیک شامل DNA قطعه شده می‌باشد. هنگامی که با گروه کنترل مقایسه می‌گردد، تیمار شده‌ها در ۰/۳٪ DMSO (A)، تعداد بسیار زیادی از سلول‌های انکوبه شده با کمپلکس (۱)، (A')، هسته آپوپتیک را نشان می‌دهند. به شکل مشابه، B و B' برای کمپلکس (۲)، C و C' برای کمپلکس (۳)، به دست می‌آیند.

نتیجه گیری

منظور مقایسه خاصیت سایتوتوکسیک این ترکیب با داروهای رایج در شیمی‌درمانی، خاصیت سایتوتوکسیک داروی سیس-پلاتین نیز به عنوان مرجع، مورد بررسی قرار گرفت.

سپاسگزاری

تمامی هزینه مالی این پروژه تحقیقاتی از محل طرح پژوهشی ۳۳۴۸۶ مورخ ۱۳۹۳/۱۲/۰۵ در گروه شیمی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تأمین اعتبار گردیده است. از مسئولین محترم دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد و نیز دانشگاه علوم پزشکی مشهد، برای تأمین مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

در این پروژه، کمپلکس‌هایی از فلز نیکل (II) با لیگاندهای ذکر شده، سنتز و با آنالیزهای مختلف شناسایی شدند. پس از سنتز، خاصیت ضدسرطانی و سایتوتوکسیک آن‌ها بر روی رده‌های سلولی HeLa (کارسینوما تخمدان انسانی)، MCF-7 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی مثبت)، رده سلولی MDA-MB-231 (سرطان سینه انسانی، گیرنده استروژنی منفی)، NALM-6 (سرطان سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک حاد)، Neuro-2a (نوروبلاستوما موشی) و L929 (رده سلولی فیبروبلاست موشی، سلول نرمال) با آزمون سمیت سلولی (MTT assay) و فلوسایتومتری بررسی گردید. هم چنین، به-

منابع

۱. پرویز قدیریان. سرطان: علل بروز و چگونگی پیشگیری، انتشارات فردوس، ۱۳۹۱، چاپ اول، ۱۱-۳.
2. Afrasiabi Z, Sinn E, Chen J, Ma Y, Rheingold AL, Zakharov LN, Rath N, Padhye S. Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. *Inorg. Chim. Acta.* 2004; 357: 271-278.
3. Afrasiabi Z, Sinn E, Lin W, Ma Y, Campana C, Padhye S. Nickel (II) complexes of naphthaquinone thiosemicarbazone and semicarbazone: Synthesis, structure, spectroscopy, and biological activity. *J. Inorg. Biochem.*, 2005; 99: 1526-1531.
4. Bernstein LR, Tanner T, Godfrey C, Noll B. Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral gallium bioavailability. *Met. Based Drugs.* 2000; 7: 33-47.
5. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* 1999; 99: 2293-2352.
6. Chen W, Sun S, Cao W, Liang Y, Song J. Antioxidant property of quercetin-Cr (III) complex: The role of Cr (III) ion *J. Mol. Struct.* 2009; 918: 194-197.
7. Chen J, Huang Y.-W, Liu G, Afrasiabi Z, Sinn E, Padhye S, Ma Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 2004; 197: 40-48.
8. Salehi S, Sh. Saljooghi A, Shiri A. Synthesis, characterization and in vitro anticancer evaluation of two novel derivatives of deferasirox iron chelator. *Euro. J. Pharmacol.* 2016, 78: 209-217.
9. Frisardi V, Solfrizzi V, Capurso C, Kehoe PG, Imbimbo BP, Santamato A, Dellegrazie F, Seripa D, Pilotto A, Capurso A, Panza F. Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20(1): 17-30.
10. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992; 13: 795-808.
11. Hanif M, Henke H, Meier SM, Martic S, Labib M, Kandioller W, Jakupec MA, Arion VB, Kraatz H-B, Keppler BK, Hartinger CG. Is the Reactivity of M(II)-Arene Complexes of 3-Hydroxy-2(1H)-pyridones to Biomolecules the Anticancer Activity Determining Parameter? *Inorg. Chem.* 2010; 49: 7953-7963.
12. Heng MP, Sinniah SK, Teoh WY, Sim KS, Ng SW, Cheah YK, Tan KW. Spectrochim. Synthesis of a DNA-targeting nickel (II) complex with testosterone thiosemicarbazone which exhibits selective cytotoxicity towards human prostate cancer cells (LNCaP). *Acta Mol. Biomol.* 2015; 150: 360-372.
13. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008; 2: 183-194.
14. Joseph J, Nagashri K. Novel copper-based therapeutic agent for anti-inflammatory: synthesis, characterization, and biochemical activities of copper(II) complexes of hydroxyflavone Schiff bases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012; 167: 1446-1458.
15. Kalaivani P, Saranya S, Poornima P, Prabhakaran R, Dallemer F, Vijaya Padma V, Natarajan K. Biological evaluation of new nickel(II) metallates: Synthesis, DNA/protein binding and mitochondrial mediated apoptosis in human lung cancer cells (A549) via ROS hypergeneration and depletion of cellular antioxidant pool *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 82: 584-599.
16. Kandioller W, Kurzwernhart A, Hanif M, Meier SM, Henke H, Keppler BK, Hartinger CG. Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. *J. Organomet. Chem.* 2011; 696: 999-1010.
17. Kong D.-Y, Meng L.-H, Ding J, Xie Y.-Y, Huang X. New tetraazamacrocyclic ligand with neutral pendent groups 1,4,7,10-tetrakis(2-cyanoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (L) and its cobalt(II), nickel(II) and copper(II) complexes: synthesis, structural characterization and antitumor activity. *Polyhedron*, 2000; 19: 217-223.

18. Kumar RR, Subarkhan MK, Ramesh R. Synthesis and structure of nickel(II) thiocarboxamide complexes: effect of ligand substitutions on DNA/protein binding, antioxidant and cytotoxicity, *RSC Adv*, 2015; 5: 46760–46773.
19. LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi E, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. *Carcinogenesis*, 2009; 30:1298–1304.
20. Liu G, Liao J, Huang S, Shen G, Yu R. Fluorescence Spectral Study of Interaction of Water-soluble Metal Complexes of Schiff-base and DNA. *Anal. Sci.*, 2001; 17: 1031-1036.
21. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182: 56-1545.
22. McNeill JH, Yuen VG, Hoveyda HR, Orvig C. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic *J. Med. Chem.* 1992; 35: 1489–1491.
23. Merbach A, Helm L, Toth E, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, 2nd Edn, 2013.
24. Meshkini A, Yazdanparast R. Chemo sensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. *Exp Mol Pathol*, 2010; 89: 42-334.
25. Monga V, Patrick BO, Orvig C. Group 13 and lanthanide complexes with mixed O, S anionic ligands derived from maltol. *Inorg. Chem.* 2005; 44: 2666–2677.
26. Rodriguez-Arguelles MC, Ferrari MB, Bisceglie F, Pelizzi C, Pelosi G, Pinelli S, Sassi M. J. *Inorg. Biochem.* Synthesis, characterization and biological activity of Ni, Cu and Zn complexes of isatin hydrazones. 2004; 98: 313-321.
27. Gray HB, Stiefel EI, Valentine JS, Bertini I, *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*, 1st Edition, University Science Book, 2006; Ch. 4, 53-91.
28. Selvakumaran N, Bhuvanesh NSP, Endo A, Karvembu R. Synthesis, structure, DNA and protein binding studies, and cytotoxic activity of nickel(II) complexes containing 3,3-dialkyl/aryl-1-(2,4-dichlorobenzoyl)thiourea ligands. *Polyhedron*. 2014; 75: 95–109.
29. Shrivastav A, Singh NK, Singh SM. Shrivastav A, Singh NK, Singh SM. 2002 Synthesis, characterization and antitumor studies of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of N-salicyloyl-N'-o-hydroxythiobenzhydrazide. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002; 10: 887-895.
29. Takimoto CH, Calvo E. *Principles of Oncologic Pharmacotherapy in Pazdur R Wagman LD Camphausen KA Hoskins WJ (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 11 ed. 2008.
30. Toth E, Helm L, Merbach AE, Hedinger R, Hegetschweiler K, Janossy A. Structure and Dynamics of a Trinuclear Gadolinium(III) Complex: The Effect of Intramolecular Electron Spin Relaxation on Its Proton Relaxivity(1). *Inorg. Chem.* 1998; 37: 4104–4113.
31. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184: 39-51.
32. Jones CJ. *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. Royal Society Of Chemistry. 2007; Ch. 3: 101–200.
33. Taghavi F, Gholizadeh M, Sh. Saljooghi A, Deferasirox loaded on fumed silica nanoparticles used in cancer treatment, Deferasirox loaded on fumed silica nanoparticles used in cancer treatment, *New J. Chem.*, 2016; 40, 2696-2703.
34. Zhou J, Wang LF, Wang JY, Tang N. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *J. Inorg.Biochem.* 2001; 83: 41–48.

