Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:
Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم و اثرات ضد سرطانی آنها بر رده سلولی سرطان معده MKN45

مائده دژم فکر [۱](M.Sc)، علی خالقیان [۲*](Ph.D)

۱-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲ - گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۴۴۱۰۲۱ khaleghian.ali@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۸

چکیده

هدف: سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد. اگرچه میزان بروز این سرطان در سال‌های اخیر در اغلب کشورها کاهش یافته است ولی در ایران شاهد افزایش میزان بروز این سرطان هستیم. ترکیبات سنتزی حاوی وانادیوم داروهایی امیدوارکننده با شرایط فارماکودینامیکی مطلوب و سمیت نسبتاً کم می‌باشند. با توجه به کاربردهای امیدبخشی که ترکیبات سنتزی وانادیوم در سیستم‌های پزشکی و بیولوژیکی دارند هدف این مطالعه بررسی اثرات ترکیبات سنتزی جدید وانادیوم و نحوه عملکرد آن‌ها را روی سلول‌های سرطان معده بود.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات سنتزی وانادیوم از تست‌های FRAP (Ferric reducing ability of plasma) و DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrate) استفاده شد. هم‌چنین رده سلولیMKN45 به عنوان نماینده سلول‌های سرطان معده کشت داده شد. سپس، برای به دست آوردن IC50(The half maximal inhibitoryconcentration) ترکیبات سنتزی وانادیوم از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جهت تست MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. در ادامه، اثر ترکیبات سنتزی وانادیوم بر مرگ سلولی با بررسی مورفولوژی سلول‌ها و قدرت تهاجم سلول‌ها مطالعه شد.

یافته‌ها: با افزایش دوز ترکیبات سنتزی وانادیوم به طور معنی داری درصد زنده‌مانی سلول‌هایMKN45 کاهش و خاصیت خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها افزایش یافت. دوز موثر برایIC50 سلول‌هایMKN45، دوز ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیبات وانادیوم با غلظت µg/ml ۱ به صورت وابسته به زمان باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis)در سلول های سرطانی شده که تایید کننده آن تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی تحت تیمار با ترکیبات وانادیوم می باشد. همچنین بررسی قدرت تهاجم سلولهای تیمار شده نشان داد که در غلظت µg/ml ۱ از این ترکیبات با گذشت زمان قدرت متاستازی به شکل چشمگیری کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که کمپلکس‌های سنتزی می‌توانند به طور موثری موجب کاهش رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌هایMKN45 شوند و شرایط افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها را ایجاد کنند.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس سنتزی، وانادیوم،MKN45، FRAP، DPPH و Apoptosis

مقدمه

امروزه سرطان یکی مشکلات اصلی در حوضه سلامت در سراسر دنیا به حساب می‌آید. سرطان به بیماری گفته می‌شود که سلول از مسیر طبیعی رشد و تکثیر خود خارج شده و دچار تکثیر غیرقابل کنترل شود. عوامل بسیاری می‌توانند موجب سرطان معده شوند مانند وراثت و یا جهش‌هایی که در طی سال‌های زندگی فرد اتفاق می‌افتد، عفونت با هلیکوباکترپیلوری و یا هر عاملی در سبک زندگی و تغذیه که موجب ایجاد التهاب مزمن در معده شود. سرطان معده چهارمین سرطان رایج و دومین عامل مرگ و میر در جهان است [۱]. سرطان معده عموماً از یک زخم یا پیتیک در لایه مخاطی معده شروع می‌شود که اگر در مراحل ابتدایی تشخیص داده شود به طور کامل قابل درمان است. اما به دلیل نداشتن علائم خاصی در این مرحله می‌تواند پیشرفت کند و به صورت بدخیمی تمام لایه‌های معده را درگیر کند و نهایت به بافت‌های دیگر نیز منتقل شود [۲]. درمان این بیماری معمولاً به مرحله پیشرفت بیماری بستگی دارد اما درمان رایج برای آن جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی است. درمان‌های بسیاری برای مبتلان به سرطان معده وجود دارد از درمان‌های استاندارد

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

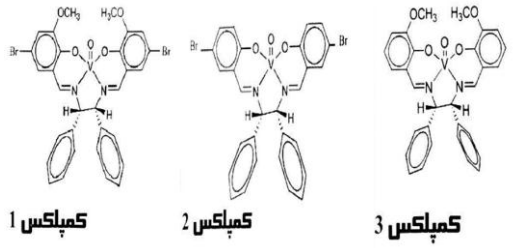
تا درمان‌هایی که طیپژوهش‌های بالینی در مرحله آزمایش هستند. پژوهشگران هم‌چنان به دنبال یافتن ترکیباتی هستند که علاوه بر داشتن مخاطرات کم‌تر برای بیمار بیش‌ترین اثربخشی و کم‌ترین سمیت را برای سلول‌هایسالم داشته باشند تا بتوانند کمک‌کننده یا جایگزینی در کنار درمان‌های استاندارد برای تسریع در بهبود بیماران باشند [۳]. از جمله این ترکیباتمی‌توان به داروی شیمی‌درمانی سیس پلاتین اشاره کرد که دارای پلاتینیوم است و پس از ورود به سلول می‌تواند همانندسازی DNA را متوقف کند. اما از معایب آن هزینه بالای آن برای بیماران و اختصاصی نبودن آن است یعنی علاوه بر بافت سرطانی به بافت‌های سالم بیمار نیز آسیب می‌رساند [۴].

وانادیوم عنصری از فلزهای واسته است با عدد اتمی ۲۳ است که در سال‌های اخیر از لحاظ علمی و بیولوژیکی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. زیرا مشخص شده است که وانادیوم و کمپلکس‌های آن دارای خاصیت‌های بیولوژیکی فراوانی مانند سمیت بسیار کم در دوز پائین و عملکرد ضد توموری هستند [۵]. وانادیوم می‌تواند سطح اکسیداسیون‌های مختلفی از ($^{-3}$) تا ($^{+5}$) دارد که به راحتی قابل تبدیل شدن به هم هستند. اما دو فرم رایج که پایداری بیش‌تری در شرایط فیزیوژیک دارند وانادیوم با سطح اکسیداسیون (IV) است که به فرم کاتیونیک وجود دارد و در شرایط فیزیولوژیک عملکردی شبیه Mg^{2+} دارد و مثال آن وانادیل (VO^{2+}) است. فرم دیگر وانادیوم با سطح اکسیداسیون (V)است که معمولاً به فرم آنیونیک است و می‌تواند در شرایط فیزیولوژیک عملکردی شبیه فسفات داشته باشد که مثال بارز آن متاوانادات (VO^{-}) و یا ارتووانادات ($H_2VO_4^{-}$) است [۶]. وانادیوم می‌تواند از طریق تشکیل پیوند و یا از طریق تقلید عمل فسفات آنزیم‌های بسیاری مانندPTPها، ATPaseها و امثال آن‌ها را فعال و یا غیر فعال کند و از این طریق بر بسیاری از فرایندهای فیزولوژیک مانند بیان ژن‌ها،مسیرهای سیگنالینگ، رشد و تکثیر سلول‌ها،مرگسلولی، تعدیل برداشت قند خون توسط سلول و... تاثیر داشته باشد [۸،۷]. اولین بار اثر ضد سرطانی وانادیوم در مطالعه‌ای که بر روی رت‌های دارای سرطان سینه القاء شده در ۱۹۸۴ مورد بررسی قرار گرفت [۹]. مشاهدات نشان داده است که ترکیبات وانادیوم در قطعه قطعه شدن DNA،توقف سیکل سلولی و لیپوپراکسیداسیون غشاء پلاسمایی نقش دارند [۱۰]. تحقیقات نشان می‌دهند که کمپلکس‌های مختلف وانادیوم اثر ضد سرطانی بیش‌تری را به نسبت نمک‌های وانادیوم نشان می‌دهند [۱۱]. تحقیقی که در سال ۲۰۰۳ انجام شده است نشان می‌دهد که ساخت کمپلکس وانادیل به همراه یک آنتی‌اکسیدان موجب افزایش اثر کاهندگی قند خون وانادیوم می‌شود [۱۲].

تفاوت ترکیبات مورد استفاده در این پژوهش در استخلاف‌های گروه آلدهید کمپلکس‌هااست،بهاین صورت که کمپلکس وانادیوم ۱ (ComV1) دارای لیگاندهای برم (Br) در موقعیت متا و متوکسی (H3CO) در موقعیت ارتو است. کمپلکس وانادیوم ۲ (ComV2) فقط دارای لیگاند Br در جایگاه متا است و کمپلکس وانادیوم ۳ (ComV3) تنها دارای لیگاند H3CO در موقعیت ارتو است (شکل ۱).

در مطالعه حاضر هدف ما از انجام این مطالعه بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم بود که برای اولین بار عملکرد بیولوژیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. در این راستا از تست‌های آنتی‌اکسیدانی عمومی مثل DPPHو FRAP و تست سنجش سمیت سلولیMTT، مهاجرت سلولی (Migration) و القای آپوپتوزیس استفاده شد.

شکل۱. ساختار کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم. به ترتیب از سمت چپ ComV1، ComV2 و ComV3.



مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش سه کمپلکس سنتزی وانادیوم که ساختارآن‌هادر (شکل ۱) آمدهاستازدپارتمانشیمی دانشگاه سمنان تهیه شد[۱۳]. ابتدا یک استوک اولیهیا غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) از هرکدام از کمپلکس‌هاتهیه شد. سپس غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای تست‌های آنتی‌اکسیدانی و غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به منظور بررسی قدرت ضدسرطانی ترکیبات در حلال‌های مورد نیاز تهیه شد.

انتخاب دوز ترکیبات سنتزی بر اساس نوع تست‌های مختلف سلولی و شیمیایی متفاوت بود و هر کدام در دامنه کاری که مقالات مشابه برای ترکیبات سنتزی هم ارز انجام داده بودند، انتخاب شدند به طوری که در مطالعه حاضر دامنه وسیعی از غلظت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بدیهی است به جهت کاهش عوارض جانبی بایستی در کم‌ترین میزان مورد نیاز از ترکیباتشیمیایی جهت اعمال اثر بیولوژیکی مورد استفاده قرار بگیرد[۱۴،۱۵،۱۶].

این پژوهش با کد اخلاق IR.semums.REC.1394.118:به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه رسیده است و برای انجام این

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

پژوهش مواد آسکوربیک اسیدMercK (VitC)، ۵-فلوروئوزاسیل(5-FU)(5- Fluorouracil)از شرکت Sigma، سلول‌هایMKN45 نمایندگی سلول‌های سرطان معده از انیستیتو پاستور ایران، محیط کشتRPMI Gibco، (Phosphate-buffered saline)PBS، تریپسین،DMSO، رنگ-MTT3(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide، رنگ اتیدیوم بروماید و اکریدین ارنج از شرکت Sigmaتهیه شد.

تست‌های آنتی‌اکسیدانی:برای انجام تست‌های آنتی‌اکسیدانی ابتدا غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر کمپلکس‌های وانادیوم و ویتامین (VitC) Cدر حلال مورد نیاز تهیه شد.

تست-(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate)DPPH:رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با رنگ بنفش و دارای بیشینه جذب در طول موج ۵۱۵-۵۲۰ نانومتر است. رادیکال DPPH وقتی با آنتی‌اکسیدان‌هایی که دهنده هیدروژن می‌باشند واکنش می‌دهد رنگ محلول از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب کاهش می‌یابد و شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه‌گیری است. اثر آنتی‌اکسیدانی با از بین رفتن رادیکال DPPH در نمونه متناسب است[۱۷].

مقدار ۵۰ ماکرومولار از غلظت‌های مختلف هریک از نمونه‌هارابا ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۴٪ ازDPPH ترکیب شد و پس از ورتکس کردن برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده و در نهایت جذب نوری هر یک را در ۵۱۷ نانومتر بررسی شد.

تستFRAP(Ferric reducing ability of plasma):این روش سنجش کلی محتوی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات است که بر اساس احیای آهن سه ظرفیتی فریک (Fe3+) توسط آنتی‌اکسیدان‌ها به آهن دو ظرفیتی فرو (Fe2+) آبی رنگ در محیط اسیدی پایه‌گذاری شده است و تغییرات رنگ و در نتیجه تغییرات جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد[۱۸].

۱ mlاز هر نمونه را با ۲/۵ mlبافر فسفات ترکیب کرده سپس ۲/۵ ml پتاسیم فری سیانید ۱٪ (۱۰ mg/ml)را اضافه کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه ۲/۵ ml تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpmسانتریفوژ شد. سپس ۲/۵ ml از محلول رویی برداشته در لوله دیگر ریخته و ۲/۵ ml آب مقطر اضافه شد. ۰/۵ ml کلرید آهن ۰/۱٪ را اضافه کرده و جذب را با اسپکتروفتومتر در ۷۰۰ nm بررسی شد.

کشت سلولی:ابتدا به محیط کشت RPMI Gibco ۱٪از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتوماسین و ۱۰-۲۰٪ از سرم جنین گاو (FBS) افزوده شد. برای کشت سلول‌های MKN45 را به همراه محیط کشت RPMI ۱۰٪در فلاسک T25 ریخته و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و در اکسید کربن (CO_2) ۵٪قرار داده شد تا سلول‌هابهحدنصابرسند. FBSباید قبل از استفاده از نظر کمپلمان غیر فعال شده باشد که برای این کار ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در تمامی آزمون‌هاابتدادرصدسلول‌هایزندهبارنگتریپانبلوتعیینشدکهباید همواره بالای ۸۵٪ باشد.

بررسی سیتوتوکسیسیته سلولی شیف باز وانادیوم مورد مطالعه:تست MTT: به منظور ازریابی وضعیت سلول‌ها در محیط کشت، میزان بقاء، بررسی وضعیت سلول‌ها بعد از تیمارهای مختلف و بررسی سایتوتوکسیسیته شیف بازهای وانادیوم بر سلول‌هایMKN45 از روش MTT assay (3- (4,5-Dimethylyhiazol-2-yl) 2,5diphenyltetrazolium bromide)استفاده شد. در این روش میزان نمک تترازولیوم(Tetrazolium) محلول (زرد رنگ) است که توسط توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول‌های زنده احیاء شده و به فورمازان (Formazun) نامحلول (بنفش رنگ) تبدیل می‌شود سنجیده شد. برای این آزمایش در هر خانه پلیت ۹۶ خانه سوسپانسیونی از محیط کشت و تعداد ۵۰۰۰ سلول MKN45 را به مدت ۲۴ ساعت کشت داده و محیط کشت را تخلیه کرده و از کمپلکس‌های وانادیوم غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت آماده شده و به سلول‌هااضافهشد (غلظتنهایی DMSO کم‌تر از ۱٪ بود). بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌هاتخلیه شد و سلول‌هابهمدت ۳ ساعتدرمعرض ۱۰میکروگرم از رنگ MTTقرار گرفتند. در نهایت مجدداً محلول رنگ تخلیه و به منظور حل شدن رنگ ۱۰۰ میکرولیتر رنگ DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری در توسط دستگاه الایزا ریدردر ۵۴۰ nmخوانش شد. سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل منفی و سلول‌های تیمار شده با داروی ۵-فلوروئوراسیل تحت عنوان گروه کنترل مثبتقرار گرفتند.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها:به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های MKN45 ابتدا سلول‌هابهمدت ۲۴ ساعتفلاسک‌های T25کشت داده شدند سپس به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کمپلکس‌های وانادیوم برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ از آن‌ها تصویر تهیه شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

بررسی آپوپتوز با رنگ‌آمیزی اکریدین ارنج/ اتیدیوم بروماید (AO/EB)Ethidium Bromide/Acridin Orange:سلول‌های MKN45 را در فلاسک‌های T25 کشت داده و بعد به حد نصاب رسیدن سلول‌هابرای زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت محیط کشت سلول‌هایا محیط کشت حاوی غلظت‌های ۰،۵، ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از کمپلکس‌های وانادیوم و غلظت‌های۱، ۵، و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی ۵-فلوروئوراسیل(5-FU)-5 Fluorouracilتعویض شد. در هر یک از زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت سلول‌هارابه کمک تریپسین از کف جدا شد. برای تهیه هرکدام از رنگ‌هامقدار ۱۰۰ میکروگرم از رنگ را در ۱ میلی‌لیتر PBS ترکیب کرده و ترکیبی با نسبت حجمییک به یک از هر دو رنگ تهیه شد. ۵۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که دارای ۴×۱۰^{۴}سلول است را با ۱ میکرولیتر از محلول رنگ AO/EBترکیب شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن را روی لام با میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد. در زمان‌ها ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ازسلول‌های رنگ شده توسط دوربین و میکروسکوپ فلوروسنت تصویر تهیه شد و برای به دست آوردن میزان آپوپتوز در سلول‌هاحداقل ۱۰ میدان مختلف شمارش شد.

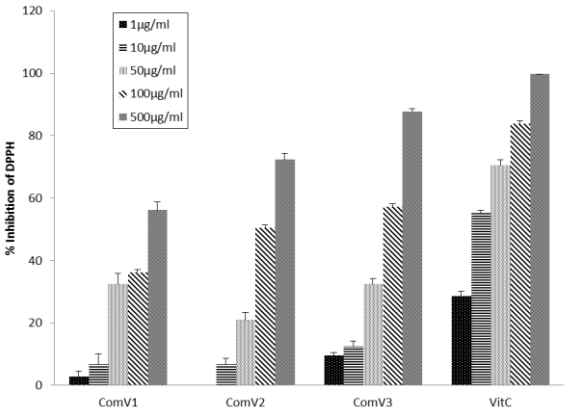
ارزیابی قدرت تهاجم سلول‌ها(Migration):برای انجام تست Migration که برای بررسی قدرت تهاجم سلول‌هاانجاممی‌شود ابتدا سلول‌های MKN45 با تراکم سلولی ۱×۱۰^{۵}سلول در حجم ۱mlرا در پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده و بعد از رسیدن به تراکم ۸۰٪ در وسط هر یک از چاهک‌هاودرمیان سلول‌هاشیار ایجاد کرده و سپس با غلظت‌های ۰،۵، ۱، ۱۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از کمپلکس‌های وانادیوم و ۵-فلوروئوراسیل در محیط کشت سلول‌هاراتیمار کرده و با تصویربرداری از سلول‌هادرزمان‌های مختلف میزان پر شدن شیار ارزیابی شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:برای تجزیه تحلیل داده‌هاازنرم‌افزار IBM SPSS Statistics 20 و Microsift Exel 2010 استفاده شد. به منظور بررسی تفاوت بین گروه‌ها از روش‌های‌تزوجی و آنالیز واریانسیک طرفه (Tukay) و من‌ویتنی انجام شد با سطح معنی‌داری$P<۰/۰۵$.

نتایج

نتایج حاصل از تست DPPH:به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر یک از کمپلکس‌های وانادیوم از ویتامینC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از هر کمپلکس وانادیوم و ویتامینC غلظت‌های۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و آزمایش انجام شد. همان‌طور که در (شکل ۲) مشخص است هر سه ترکیب از وانادیوم شباهت معنی‌داری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با VitC نشان می‌دهند و کمپلکس V3 بیش‌ترین درصد مهار DPPH را در بین ترکیبات داشته است. (شکل ۲)

نتایج تحلیل داده‌ها با کمک آزمون آماری مجذور کای نشان داد که با تمام غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیبات سنتزی با ارتباط معنی‌داری، با خواص آنتی‌اکسیدانی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامینC برابری کرده است.



شکل ۲. نتایجتست DPPH. میانگین نتایج حاصل از سه بار تکرار مستقل تست DPPH برایهر نمونه با ($P\leq۰/۰۵$) است. در این‌جا آسکوربیک اسید (VitC) کنترل مثبت است.

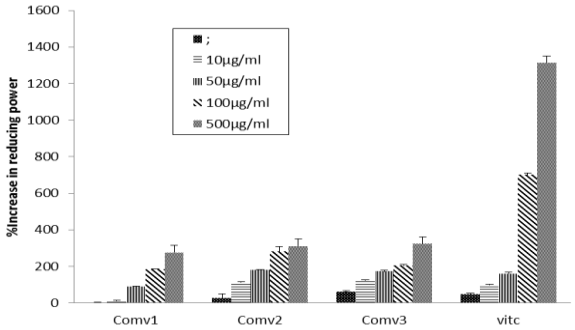
معمولاً نتایج تست DPPH به صورت EC_{50} بیان می‌شود. EC_{50} (Half-Maximal Effective Concentration) غلظتی از نمونه‌ها است که توان مهار ۵۰٪ ازDPPH را دارد. (جدول ۱).

جدول ۱. محاصبه EC50 برای هر یک از کمپلکس‌های V1، V2 و V3 در برابر ویتامین سی (VitC) که کنترل مثبت است. نتایج نشان می‌دهند کمپلکس V3 در دوز پائین‌تری نسبت به سایر ترکیبات توان مهار ۵۰٪ DPPH را دارد. در حالی که این اتفاق برای کمپلکس‌های V2 و V1 به ترتیب در غلظت‌های بالاتری زخ می دهد

Compound	EC50(µg/ml)
V1	۳۱۶/۸۲۸
V2	۲۵۱/۶۷۸
V3	۱۹۱/۲۰۶
VitC	۲۷/۹۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

نتایج تست FARP:آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربیک اسید معمولاً اهداءکننده الکترون یعنی احیاکننده هستند. در واقع در این آزمایش ما هیچ رادیکال آزادی در محیط نداریم ولی میزان احیای معرف FRAP (FeCl3) توسط واکنشگرها سنجیده می‌شود [۱۴،۱۳]. برای هرکدام از سه ترکیبوانادیوم و کنترل مثبت آسکوربیک اسید (VitC) غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه با کمک تست آماری مجذور کای نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های وانادیوم و ویتامینc وجود ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).(شکل ۳)



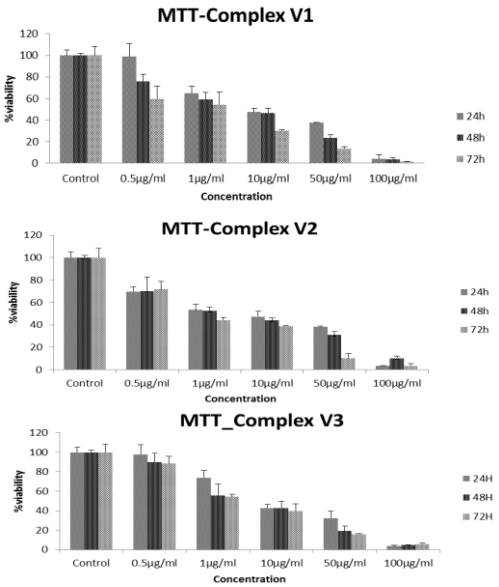
شکل۳. نتایج حاصل از تست FRAP برای هر یک از کمپلکس‌هایV1، V2 و V3. ویتامینC به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

بررسی قدرت بقاء و مرگ سلولی در سلول‌هایMKN45:

MTT: نتایج حاصل از تست MTT نشان می‌دهد که به نسبت کنترل که سلول‌های تیمار نشده هستند روند رشد سلولی کاهش پیدا کرده و در نهایت کاهش در تعداد سلول‌ها مشاهده می‌شود. در تست MTT مشخص شد که ComV1، ComV2 و ComV3 می‌توانند وابسته به دوز و وابسته به زمان باعث کاهش رشد و افزایش مرگ سلولی شوند. OD به دست آمده از خانه‌هایی که با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ از هرکدام کمپلکس‌هاتیمار شده‌اندنشان‌دهندهرشدبسیار کم سلول‌هاوتوکسیسیتی بالای ترکیبات برای سلول‌های سرطان معده است. (شکل۳) هم‌چنین توسط تست MTT مشخص شده است که IC50 (غلظتی از ترکیبات که توانایی مهار رشد ۵۰٪ از سلول‌هاراداراامی‌باشند) برای هرکدام از ترکیباتComV1، ComV2 و ComV3 غلظت ۱میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد در نتیجه تست‌های بعدی بر اساس این دوز و زمان ۴۸ ساعت صورت گرفته است(شکل۴).

بررسی مورفولوژی سلول‌هایMKN45:یکی از ساده‌ترین روش‌هابرای بررسی تاثیر درمان و میزان مرگ سلولی، بررسی مورفولوژی سلول‌هااست. همان‌طور که در شکل مشخص شده است سلول‌هایMKN45 که با ترکیبات وانادیومدرمان نشده‌اندبعدازگذشت ۷۲ ساعتسلول‌ها ۱۰۰٪ کفپلیت را پوشانده‌اندو کاملاً شکل دوکی کشیده را نشان می‌دهند. اما بعد از درمان با کمپلکس V2 سلول‌های کم‌تری در پلیت رشد کردند و سلول‌هابعداز ۴۸ ساعتبیش‌تر به فرم چروکیده دیده می‌شوند که به دلیل متراکم شدن کروماتین است و کم‌تر به شکل دوکی دیده می‌شوند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت اکثر سلول‌هادفرمه و از هم متلاشی شده هستند و غشاء مشخصی ندارندکه از نشانه‌های سلول‌های آپوپتوتیک است. شبیهه این اتفاق برای سلول‌هایی که با ComV3 درمان شدند نیز دیده می‌شود اما سلول‌هایی که با ترکیبComV1 درمان شدند با سرعت کم‌تری شروع به چروکیده و جمع شدن کرده‌اند(شکل ۵).

شکل ۴. نتایج تست MTT. اثرات وابسته به غلظت و وابسته به زمان ترکیبات وانادیوم بر مهار رشد و مرگ سلول‌های MKN45در مقایسه با کنترل



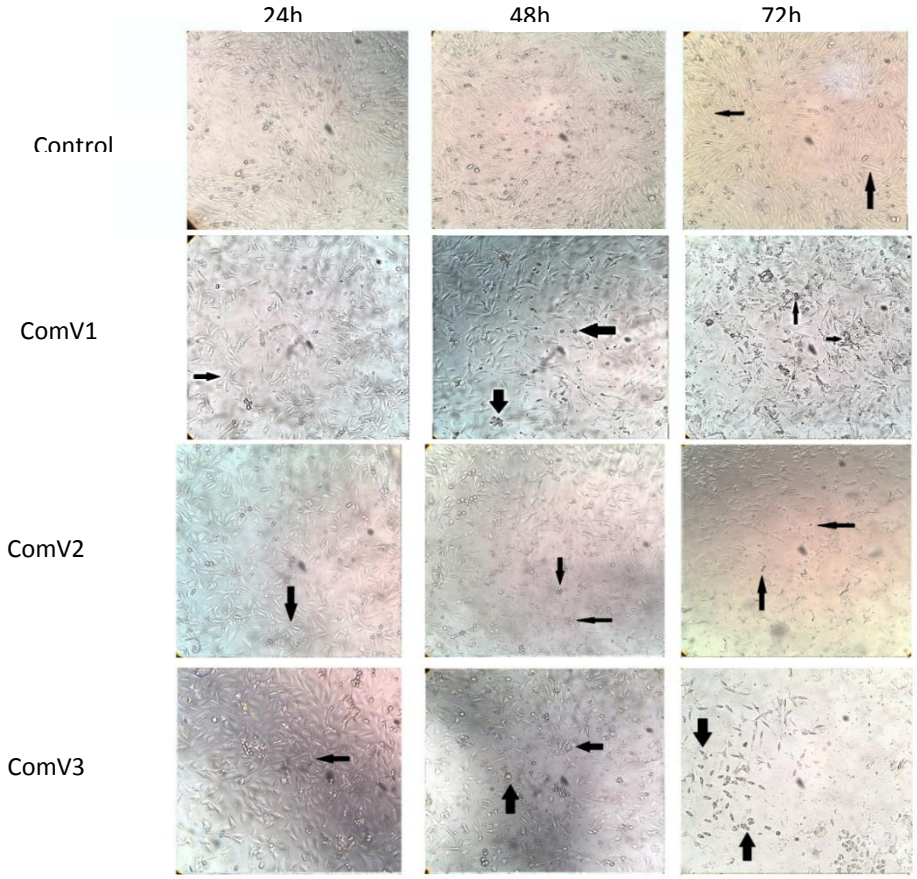
رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدینارنج (ET/AO):

از دیگر روش‌های بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده(آپوپتوز) در سلول‌هارنگ‌آمیزی سلول‌هابااتیدیوم بروماید و اکریدینارنج است. اکریدین ارنج(AO) رنگ حیاتی است که به DNA و RNA سلول‌های مرده و زنده متصل می‌شود و سلول را به رنگ سبز در می‌آورد. رنگ اتدیوم برماید(EB) وارد سلول‌هایی که تمامیت غشا خود را از دست داده‌اند می‌شود و به سلول رنگ قرمز می‌دهد. (شکل۶)

همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود سلول‌های کنترل که با ترکیبات وانادیوم درمان نشده‌اند از زمان صفرتا ۷۲ساعت بعد به میزان بسیار کمی دچار آپوپتوز شده‌اند (حدود ۲-۶٪ طی ۲۴ ساعت) اما در مقابل سلول‌هایMKN45 که با داروی ۵-فولوروئوراسیل به عنوان کنترل مثبت درمان شده‌انداززمانتیمار تا

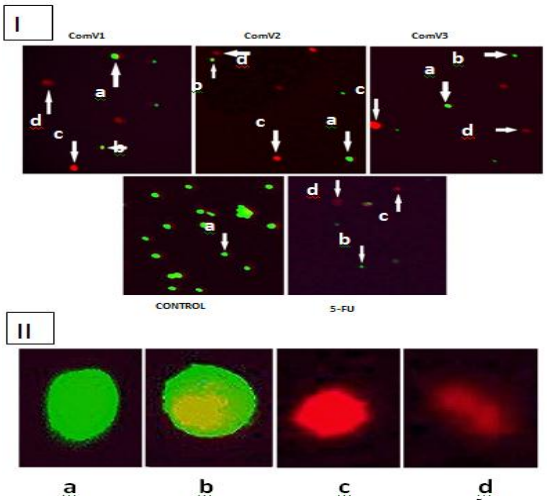
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

۷۲ ساعت بعد حدود ۶۰-۷۵٪ دچار آپوپتوز شده‌اند. هم‌چنین سلول‌هایی که با ترکیبComV2 درمان حدود ۴۷-۵۶٪ از سلول‌هادچارآپوپتوزشده‌اند. این مقدار برایسلول‌هایی که با ComV1 درمان شده‌اندحدود ۳۵-۴۶٪ است، اما برای سلول‌هایی که با ComV3 درمان شده‌اندبرابر ۲۶-۴۶٪ است.(شکل ۶ و ۷)



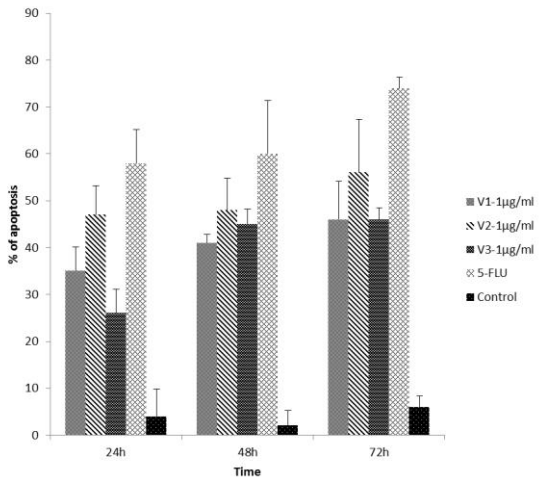
شکل ۵. بررسیمیزان آپوپتوز در سلول‌هایMKN45 قبل و بعداز درمان با ترکیبات وانادیوم. نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است(P≤۰/۰۵). در این آزمایش کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت ۵-فلوروئوراسیل است.

بررسی قدرت تهاجم سلول (Migration):قدرت تهاجم یا قدر ترمیم زخم توانایی در سلول‌هااستکهبهقدرترشدوتکثیر سلول‌هابستگی دارد. این توانایی در سلول‌های سرطانی می‌تواند روند بهبود را به تاخیر انداخته و موجب تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی شود. به منظور بررسی قدرت تهاجم سلول‌هایMKN45 بعد از کشت در میان سلول‌هاشکافی ایجاد شد و سپس برای مقایسه بهتر برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت با دوز (IC50)µg/ml ۱از کمپلکس‌های وانادیوم تیمار شدند. همان‌طور که در تصاویر پائین مشخص است در مقایسه با کنترل که سلول‌های تیمار نشده MKN45 هستند سلول‌هانتوانستندازمان صفر (زمان ایجاد شکاف) تا ۷۲ ساعت بعد شکاف ایجاد شده را ترمیم کنند و قدرت تهاجم و ترمیم زخم را از دست داده‌اند. (شکل ۸)

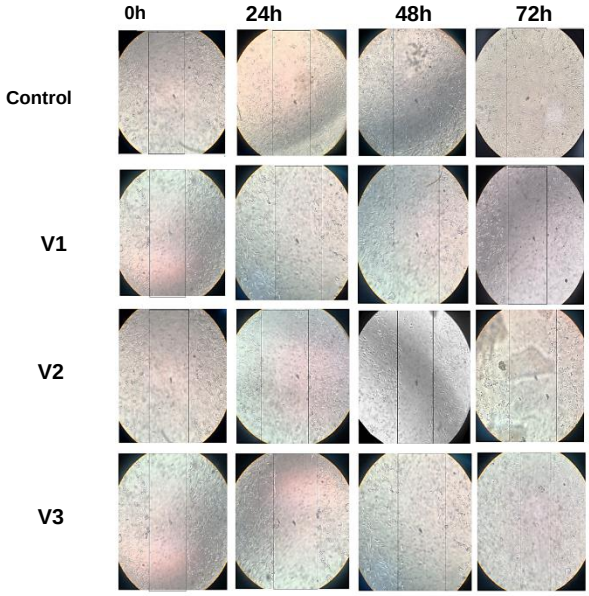


شکل۶. رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج (EB/AO). تیمار با غلظت µg/ml۱ سلول‌هایMKN45 بعد از ۴۸ ساعت. شکل (I)بزرگ‌نمایی X40. شکل (II) بزرگ‌نمایی X100. (a) نشانه سلول‌های زنده(b) سلول‌هاییکه در مراحل اولیه آپوپتوز هستند (Aerly apoptosis) (c) نشانه سلول‌های نکروز شده(d) سلول‌هایواقع در مراحل انتهایی آپوپتوز (Late apoptosis).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]



شکل ۷.بررسی میزان آپوپتوزدر سلول‌های MKN45 قبل و بعداز درمان با ترکیبات وانادیوم. نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است. ($P\leq0.05$). در این آزمایش کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت ۵-فلوروئوراسیل است.



شکل ۸. تیمار سلول‌های MKN_{45} با دوز۱µg/ml از کمپلکس‌های V1، V2 و V3 و تصویر برداری از سلول‌ها در لحظه ایجاد شکاف (لحظه صفر) بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت.همانطور که در تصاویر مشخص است سلول‌های کنترل با گذشت ۷۲ ساعت توانستند کاملا شکاف ایجاد شده را ترمیم کنند، اما ترمیم برای سلول‌ها درمان شده با ترکیبات وانادیوم رخ نداده است. تمام عکس‌ها با بزرگنمایی X40 گرفته شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از انجام تست آنتی‌اکسیدانیDPPH در این پژوهش نشان می‌دهد که هر سه کمپلکس وانادیوم توان آنتی‌اکسیدانی نسبتاً خوبی را در مقایسه با کنترل مثبت ویتامینC نشان داده‌اند و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با ترکیبات سنتزیوانادیوم و کنترل دیده نشده است. با توجه به این‌که هر سه کمپلکس دارای ساختار پایه یکسانی هستند بررسی داده‌های حاصل از تست DPPH نشان می‌دهد که ComV3 توانسته است در غلظت‌های مختلف درصد بیش‌تری از مهار DPPH را نشان دهد که می‌تواند به دلیل وجود استخلاف متوکسی (H3CO) در موقعیت ارتو آلدهید این ترکیب باشد، زیرا متوکسی در این جایگاه خاصیت الکترون دهندگی خوبی دارد. اما ComV1 که هم‌زمان دارای استخلاف Br در موقعیت متا به عنوان یک الکترون کشنده و استخلاف H3CO در موقعیت ارتو است، کم‌ترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH را نسبت سایر ترکیبات در غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. هم‌چنین محاسبه EC50 برای هر نمونه نشان می‌دهد که ComV3 در غلظت کم‌تری (µg/ml ۱۹۱،۲۰۶) نسبت به دو کمپلکس دیگر توانسته است ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد را مهار کند.

بررسی نتایج آزمایشFRAP نیز نشان می‌دهد که هر سه کمپلکس وانادیوم توانایی احیای آهن سه ظرفیتی را در مقایسه با گروه کنترل ویتامینC دارند. ComV3 در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین میزان احیاکنندگی را در مقایسه با دو کمپلکس دیگر حاوی وانادیوم دارد. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترComV2 که تنها دارای استخلاف Br در موقعیت متا است توانسته است بیش‌ترین میزان احیایFeCl3 را داشته باشد. اما ComV1 در تمام غلظت‌هاکم‌ترین میزان احیای آهن را در مقایسه با دو کمپلکس دیگر نشان داده است.

بررسی متون گذشته نشان داده‌اند که ترکیبات دارای وانادیوم می‌توانند با تغییر سطح اکسیداسیون و تاثیر بر عملکرد آنزیم‌ها و پروتئین‌های مختلف به خصوص از طریق فسفریلاسیون و دفسفوریلاسیدن پروتئین تیروزین فسفاتاز(PTP) بر مسیرهای آپوپتوز رشد و تکثیر، التهاب و سیستم ردوکس سلولی تاثیر داشته باشند و ممکن است از این طریق بتوانند در درمان بیماری‌های مزمن مانند دیابت و سرطان نقش داشته باشند [۱۹-۲۳].

در سال ۲۰۱۴ Shengyi lui و همکارانش بر روی اثرات بیولوژیک آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی کمپلکس‌های جدید وانادیوم تحقیق کردند. نتایج حاصل از آزمایشDPPH نشان می‌دهد که کمپلکس وانادیوم توانسته است توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به آلژینات پلی‌سچوراد (APS) و آلژینات الیگوسچوراد (AOS) داشته باشد. هم‌چنین کمپلکس‌های وانادیوم توانسته‌اند قدرت بقاء رده سلولی هپاتومای انسانی را کاهش داده و از طریق مهار پروتئین تیروزین فسفاتاز-B۱ باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌ها شوند[۲۳].

مطالعه ما همسو با این مطالعه نشان داد که ترکیبات سنتزی حاوی وانادیوم دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند و هم‌چنین هر سه ترکیب سنتزی وانادیوم توانستند قدرت بقای سلول‌های سرطانیMKN45 را کاهش دهند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

بررسی میزان سمیت و کشندگی کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم و به دست آوردن IC50 ترکیبات از طریق آزمونMTT برای غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. نتایج حاصل از آن نشان می‌دهد که هر سه کمپلکس سنتزی وانادیوم وابسته به زمان و وابسته به غلظت می‌توانند موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌هایMKN45 شوند، و میزان نسبتاً زیادی از سمیت و کشندگی را به خصوص در غلظت‌های بالا نشان می‌دهند. بررسی نتایج تست MTT نشان می‌دهد که ComV3 بعد از گذشت ۴۸ساعت و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند بیان‌کننده IC50 برای سلول‌هایMKN45 باشد این در حالی است که دو کمپلکس V1 و V2 در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بهIC50 خود برای این سلول‌هامی‌رسند. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از چندین بار تکرار آزمایشMTT در زمان‌های مختلف IC50 برای ترکیبات غلظت بین ۱ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

از آن‌جایی که این ترکیبات سنتزی مورد استفاده در این مطالعه برای اولین بار مورد بررسی بیوشیمیایی و مولکولی قرار می‌گیرند و سابقه پژوهشی در این حوزه برای آن‌ها وجود ندارد و تنها این نتایج را می‌توان با ترکیبات مشابهی که روی سل لاین‌های دیگری اثر داده شده است را مقایسه کرد که بررسی ما نشان داد که میزانIC50 به‌دست آمده در این مطالعه در دامنه میکروگرم بر میلی‌لیتر است اما غالب مقالات مشابه در دامنه میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به IC50 مطلوب رسیده‌اند و از آن‌جا که دوز کم‌تر ایجاد عوارض جانبی کم‌تر را به دنبال خواهد داشت می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات نتایج مطلوب‌تری را نسبت به داروی استاندارد سرطان معده 5-FU با IC50= ۵mg/mlارائه داده است.

به منظور تایید نتایج حاصل از MTT و وقوع آپوپتوز در سلول‌هایMKN45 بعد از تیمار با کمپلکس‌های وانادیوم به بررسی مورفولوژی سلول‌هایMKN45، بررسی قدرت ترمیم زخم سلول‌هاورنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج پرداخته شد.

بسیاری از سلول‌هایMKN45 بعد از درمان با کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم در مقایسه با سلول‌های درمان نشده کوچک‌تر و چروکیده شدند که می‌تواند به دلیل متراکم شدن کروماتین سلول‌ها باشد و بعد از گذشت ۷۲ ساعت بسیاری از سلول‌ها به اجسام آپوپتوتیک تبدیل شده‌اند. نتایج بررسی مورفولوژی سلول‌ها نشان می‌دهد که این اتفاق در سلول‌هایMKN45 که با کمپلکس V2 درمان شده‌اند سریع‌تر از درمان با سایر کمپلکس‌ها اتفاق می‌افتد. هم‌چنین بررسی قدرت تهاجم سلول‌هایMKN45 بعد از ایجاد شکاف در میان سلول‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های درمان نشده با گذشت زمان به طور کامل توانسته‌اند فضاء خالی را پر کنند اما سلول‌هایی که با کمپلکس‌های سنتزی وانادیوم درمان شده‌اند مانع رشد و تکثیر سلول‌ها در قسمت شکاف شدند و قدرت تهاجم خود را از دست داده‌اند. از سمت دیگر نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سلول‌هایMKN45 با اتیدیومبروماید/ اکریدین ارنج نشان می‌دهد که بعد از گذشت ۴۸ ساعت از درمان سلول‌هاباکمپلکس‌های وانادیوم علاوه بر کاهش جمعیت سلول‌ها، تعداد سلول‌هایی که با رنگ اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز درآمده‌اند در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش یافته است. هم‌چنین مشخص است کمپلکسV2 توانسته است تعداد بیش‌تری از سلول‌هایMKN45 را در مقایسه با سلول‌هایی که با ۵-فلوروئوراسیل تیمار شده‌اندوسلول‌هایی که با کمپلکس‌هایV1 و V3 تیمار شده‌اند، دچار آپوپتوز کند.

مطالعه مشابهی توسط María del Carmen García-Rodríguez در سال ۲۰۱۶ بر روی اثرات ضدسرطانی وانادیوم در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامینc و الفا-توکوفرول بر روی خون محیطی موش‌ها انجام شد. آن‌هاموش‌هارابرای تیمار به ۷ گروه تقسیم کردند، یک گروه فقط از آب تغذیه کردند، یک گروه روغن ذرت، گروه دیگر با ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آسکوبیک اسید، گروه دیگر با ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آلفا توکوفرول،یک گروه با ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از وانادیوم و دو گروه دیگر به صورت ترکیبی وانادیوم به همراه آسکوربیک اسید و وانادیوم به همراه آلفاتوکوفرول گرفتند. بعد از بررسی میزان سمیت و میزان ایجاد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های خون محیطی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت متوجه شدند که درمان با وانادیوم به تنهایی و همراه با آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند موجب افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌هایخون محیطی شود اما نتایج آزمایش رنگ‌آمیزی (ET/AO) نشان می‌دهد که افزایش میزان نکروز در سلول‌هاتنهابعدازتیمار با وانادیوم به تنهایی دیده می‌شود [۱۹].

این مطالعه نیز با مطالعه ما همسو بود اما برای تیمار سلول‌های خونی از غلظت‌هایی در واحد غلظتیMg/Kg استفاده کردند که به طبع با واحد غلظتی مطالعه ما تفاوت دارد و هم‌چنین مطالعه آن‌ها بررسی روی نمونه حیوانی بود اما مطالعه ما مستقیماً ترکیبات را در معرض سلول‌هایسرطانی قرار داده‌ایم.

روزانه بیش از صدها ترکیب جدید توسط شیمی‌دان‌ها و محققان علوم دارویی سنتز می‌شود که تعداد کمی از آن‌ها در علوم مختلف کاربرد دارند[۲۴]. بسیاری از متخصصان شیمی دارویی تلاش دارند تا بتوانند با ساخت ترکیبات جدید داروهای جدید را وارد سیستم درمان کنند. برخی از محققین نیز با استفاده از فرایند مهندسی معکوس، با الگو گرفتن از داروهای موثر و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

شناخته شده در جهت تقویت اثر دارو و کاهش عوارض جانبی آن اقدام به تغییر گروه‌های عاملی و لیگاندهای متصل کرده و ترکیبات سنتزی جدید ارائه می‌دهند[۲۵]. از جمله ترکیباتی که در شیمی‌درمانی بیماران سرطانی تاثیرگذار است می‌توان به داروی سیس پلاتین اشاره کرد که با اختلال در همانندسازیDNA از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند اما به دلیل این‌که سیس پلاتین دارویی هزینه‌بر است و علاوه بر آن استفاده از آن می‌تواند به سلول‌های بافت سالم فرد نیزآسیب وارد کند در نتیجه مصرف آن با محدودیت‌های بسیاری همراه است و تحقیقات برای دست‌یابی به ترکیباتی از مواد معدنی و آلی که بتوانند به طرز موثری و با کم‌ترین سمیت برای سایر سلول‌هادردرمانسرطانمفید باشند ادامه دارد [۲۶،۲۴] و پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی به بررسی تاثیر ترکیبات سنتزی در فرایندهای مولکولی تاثیرگذار در آپوپتوزیس و بررسی تغییرات بیان ژن‌های مربوطه پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان به شماره طرح A-10-315-7انجام شده است.

منابع

[1] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer 2001; 37:S4-66.

[2] Lee MS, Lee JH, Park DJ, Lee HJ, Kim HH, Yang HK. Comparison of short- and long-term outcomes of laparoscopic-assisted total gastrectomy and open total gastrectomy in gastric cancer patients. Surg Endosc 2013; 27:2598-2605.

[3] Yada T, Yokoi C, Uemura N. The current state of diagnosis and treatment for early gastric cancer. Diagn Ther Endosc2013;2013:241320.

[4] Takimoto CH, Calvo E. Principles of oncologic pharmacotherapy. Cancer Manag 2008; 11: 1-9.

[5] Kanna PS, Mahendrakumar CB, Indira BN, Srivastawa S, Kalaiselvi K, Elayaraja T, Chatterjee M. Chemopreventive effects of vanadium toward 1, 2- dimethylhydrazine- induced genotoxicity and preneoplastic lesions in rat colon. Environ Mol Mutagen 2004; 44: 113-118.

[6] Brichard SM, Henquin JC. The role of vanadium in the management of diabetes. Trends Pharmacol Sci1995; 16: 265-270.

[7] Pessoa JC, Garribba E, Santos MF, Santos-Silva T. Vanadium and proteins: uptake, transport, structure, activity and function. Biochim Biophys Acta 2015; 301: 49-86.

[8] Tracey AS, Willsky GR, Takeuchi ES. Vanadium: chemistry, biochemistry, pharmacology and practical applications: CRC press; 2007.

[9] Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD. Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. Carcinogenesis 1984; 5: 849-851.

[10] Faneca H, Figueiredo VA, Tomaz I, Goncalves G, Avecilla F, Pedroso de Lima MC, Geraldes CF, Pessoa JC, Castro MM. Vanadium compounds as therapeutic agents: some chemical and biochemical studies. J Inorg Biochem 2009; 103: 601-608.

[11] Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, Fabbri E, Vizziello L, Khan MT, et al. Effects of vanadium complexes on cell growth of human leukemia cells and protein-DNA interactions. Oncol Rep 2005; 14: 9-15.

[12] Storr T, Mitchell D, Buglyo P, Thompson KH, Yuen VG, McNeill JH, Orvig C. Vanadyl-thiazolidinedione combination agents for diabetes therapy. Bioconjug Chem2003; 14: 212-221.

[13] Iranmanesh H, Behzad M, Bruno G, Rudbari HA, Nazari H, Mohammadi A, Taheri O. Cobalt (III) Schiff base complexes derived from mesostilbenediamine: Synthesis, characterization, crystal structure, electrochemistry and antibacterial studies, Inorganica Chim. Acta2013; 395: 81-88. (Persian).

[14] Ray RS, Ghosh B, Rana A, Chatterjee M. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. Int J Cancer 2007; 120: 13-23.

[15] Isabel Correia P, Somnath Roy, MohamedWahba, CristinaMatos,MannarR.Maurya, et al. Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. J Inorg Biochem 2014; 141: 83-93.

[16] Nair RS, Kuriakose M, Somasundaram V, Shenoi V, Kurup MR, Srinivas P.The molecular response of vanadium complexes of nicotinoyl hydrazine in cervical cancers—A possible interference with HPV oncogenic markers. Life Sci 2014; 116: 90-97.

[17] Q.-M. Hasi, Y. Fan, X.-Q. Yao, D.-C. Hu, J.-C. Liu, Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of a bidentate Schiff base ligand and its metal complexes, Polyhedron. 2016; 109: 75-80.

[18] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Japanese J Nutr Diet1986; 44: 307-315

[19] Garcia-Rodriguez Mdel C, Hernandez-Cortes LM, Altamirano-Lozano MA. In Vivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 6797851.

[20] Kioseoglou E, Petanidis S, Gabriel C, Salifoglou A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. Coordinat Chem Rev 2015; 301: 87-105.

[21] Pessoa JC, Etcheverry S, Gambino D. Vanadium compounds in medicine. Coordinat Chem Rev 2015; 301: 24-48.

[22] Yilmaz-Ozden T, Kurt-Sirin O, Tunali S, Akev N, Can A, Yanardag R. Ameliorative effect of vanadium on oxidative stress in stomach tissue of diabetic rats. Bosn J Basic Med Sci. 2014; 14: 105-109.

[23] Liu S, Liu G, Yi Y. Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: Synthesis, characterization, and biological activities. Carbohydr Polym2015; 121: 86-91.

[24] Mazani M, Hadizadeh S, Najafzadeh N, Amani M, Mansouri Torshizi H. Anti-cancer Effects of Palladium Complexes on Gastric Cancer Cell Line (AGS). J Guilan Univ Med Sci 2014; 23: 72-79. (Persian).

[25] Kooshafar Z, Salimi M, Javid A. Evaluating antitumor effect of a novel hydrazide derivative in mammalian mice model. Koomesh 2018; 20:582-587. (Persian).

[26] Yarigarravesh M H, Safakhah H A, Rashidi-Pour A, Dehghanian M. Effects of aminoguanidin on the neuropathic behavioral responses of chronic constriction injury model in rat. Koomesh 2009; 10:207-212. (Persian).

[27] Budisin NI, Majdevac IZ, Budisin ES, Manic D, Patrnogic A, Radovanovic Z. Surgery for patients with gastric cancer in the terminal stage of the illness - TNM stage IV. J BUON 2009; 14:593-603.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]

Antioxidant properties of vanadium complexes and their anticancer effects on human gastric cancer cell line MKN45

Maedeh Dejamfekr (M.Sc)[1], Ali Khaleghian (Ph.D)[*2]
1 -Student Research Committee, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2 -Dept. of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
* Corresponding author. +98 23-33441021 khaleghian.ali@gmail.com
Received: 27 Feb 2018; Accepted: 10 Oct 2018

***Introduction**:* Gastric cancer is the fourth most common cancer worldwide and the second leading cause of death from cancer. In recent years, advances in cancer therapy have raised the specter of developing effective agents of high-impact diseases, like gastric cancer, which remains one of the major causes of cancer deaths in the world. Recently it has been demonstrated that vanadium compounds exhibit a wide variety of pharmacological properties in humans. Vanadium compounds show interesting biological and pharmacological properties and some of them display antitumoral actions. However, the mechanism of action of vanadium compounds in the inhibition of cancer cell proliferation is still elusive.

***Materials and Methods**:* In this study, the antioxidant properties of the vanadium compounds were evaluated by two in vitro tests: Ferric reducing ability of plasma (FRP) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrate (DPPH) radical scavenging. The toxicity of vanadium compounds on cancer cells MKN45 (a gastric cancer cell line) was investigated by using the test MTT in various concentrations of 1, 10, 50, 100, and 500 µg/ml. The percentage of apoptotic cells, after these treatments were investigated using Acridine orange/ Ethidium bromide staining. Wound healing and morphological modification were performed in vitro to examine migration and adhesion in the gastric cancer cell line by invert microscopy.

Results: The assessments with DPPH and FRAP techniques showed that vanadium compounds have antioxidant activities. Data showed with an increasing concentration of vanadium compounds the percentage of remaining living cells of MKN45 significantly decreased ($P<0.05$). All vanadium compounds showed considerable cytotoxic activity against cancer cell lines (IC50 = 1 µg/ml). The apoptosis investigations showed that vanadium compounds can induce high percentage of apoptosis in a dose of 1 µg/ml. The apoptotic inducing effect of vanadium compounds were confirmed by morphological observation. Migration studies revealed that vanadium compounds have inhibitory effect against the metastatic potency of MKN45 cancer cell lines.

Conclusion: The results of this study showed that the vanadium compounds had high cytotoxic effect on gastric cancer cells (MKN45); and the percentage of lethality, with the passage of time and with increased concentration had risen.

***Keywords**:* MKN45 ،FRAP ،DPPH و Apoptosis, Vanadium, Synthetic Compounds

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-19]