

اثر سمیت لیگاندهای بازشیف مشتق شده از معرف گیرارد-T و کمپلکس‌های دی‌متیل قلع (IV) آن‌ها بر سلول‌های سرطانی کلون

الهام حویزی^{۱،۲}، زینب انصاری اصل^{۳*}

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۲ مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۳ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* Email: z.ansari@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۰۹

چکیده

علی‌رغم تلاش‌های فراوان هنوز درمان قطعی برای سرطان شناخته نشده است. بنابراین مطالعه ترکیباتی با خواص ضد سرطانی اهمیت ویژه‌ای دارند. هدف اصلی این پژوهش بررسی سمیت لیگاندهای بازشیف معرف گیرارد-T و کمپلکس‌های قلع (IV) آنها بر سلول‌های سرطانی کولون می باشد. سلول‌های HT29 در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک ۱٪ کشت شدند و تاثیر لیگاندها و کمپلکس‌های آنها با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ mg/ml بر این سلول‌ها در روزهای ۱ و ۲ و ۳ بررسی شد. میزان رشد، تکثیر و تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس، بررسی شد و میزان بقای سلول‌ها با آزمون MTT و رنگ‌آمیزی DAPI تعیین گشت. تیمار سلول‌ها با ترکیبات بازشیف منجر به القای مرگ سلولی بصورت وابسته به غلظت گردید بطوری‌که بعد از ۷۲ ساعت بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵ (موثرترین غلظت) mg/ml با (H_2L^1) ، (H_2L^2) ، $[SnMe_2(L^1)]$ ، $[SnMe_2(L^2)]$ به ترتیب ۲۲، ۲۹، ۱۸ و ۲۲ بود ($P < 0.05$). در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ mg/ml ترکیب $[SnMe_2(L_2)]$ (کشنده ترین ترکیب) بعد از ۷۲ ساعت بقای سلول‌ها به ترتیب ۱۸، ۲۴، ۳۴ درصد می باشد ($P < 0.05$) و بیشترین درصد آپوپتوز ۸۲٪ ($P < 0.05$) غلظت ۵ mg/ml ترکیب $[SnMe_2(L_2)]$ می‌باشد. ترکیبات سنتز شده بصورت وابسته به غلظت اثرات ضدتکثیری و توکسیک بر سلول‌های HT29 دارند.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، بقای سلولی، سلول‌های بنیادی، ضدتومور.

مقدمه

و میر در جهان محسوب می‌گردد [۱]. این سرطان اغلب به شکل پولیپ در سطح جداره داخلی روده ایجاد میشود که منشا آن پوشش داخلی روده بزرگ

سرطان انواعی مختلفی دارد که یکی از انواع بدخیم آن سرطان کلون بوده که چهارمین عامل مرگ

است [۲]. امروزه درمان سرطان بواسطه داروهای شیمیایی و القا مرگ سلولی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است [۳-۵]. موفقیت چشمگیر سیس پلاتین به عنوان یک داروی معدنی برای درمان سرطان منجر به کشف بسیاری از داروهای جدید شد، اما با توجه به محدودیت‌های داروهای پلاتین این ترکیبات نمی‌توانند سمیت سلولی قوی در برابر فنوتیپ متفاوت تومورها داشته باشند. عنصر قلع به دلیل داشتن خواص مشابه عنصر پلاتین، برای مثال اعداد اکسایش، پس از ترکیبات پلاتین در زمینه‌ی خواص ضدسرطانی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. برخی از ترکیبات آلی قلع (IV) در مواردی خاصیت ضدسرطانی بهتری نسبت به داروهای عناصر سنگین قدیمی از خود نشان داده‌اند. دلیل فعالیت ضدسرطانی این ترکیبات به توانایی برهمکنش آن‌ها با DNA نسبت داده می‌شود. در بین کمپلکس‌های آلی قلع (IV) با لیگاندهای مختلف، بازهای شیف به دلیل ویژگی‌های کوئوردینه شونده‌گی و کاربردهای بیولوژیکی‌شان اهمیت ویژه دارند [۶-۸]. Corvo و همکاران در سال ۲۰۱۶ با کمپلکس‌های از بازشیف منگنز ساخته و اعلام کردند این ترکیبات دارای خواص ضدسرطانی قابل توجهی بر رده سلول‌های سرطانی کلورکتال می‌باشند [۹]. همچنین Demirci و همکاران در سال ۲۰۱۷ موفق به سنتز ترکیبات بازیف از فلز مس شدند که این ترکیبات خواص ضدسرطانی داشته و باعث مهار تکثیر در سلول‌های سرطانی پروستات شده است آنها اعلام کردند که این ترکیبات توانایی نفوذ در ساختار DNA سلول سرطانی را داشته و به این دلیل سبب مهار کلیواژ در سلول‌های سرطانی می‌گردند [۱۰]. مطالعات متفاوتی انجام شده که نشان دهنده اهمیت ترکیبات بازشیف فلزات مختلف و

کمپلکس آنها بر انواع سلول‌های سرطانی بود است همچنانکه Duff و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ترکیبات باز شیف سنتز شده آنها از فلز مس دارای خاصیت ضد سرطانی بر علیه سلول‌های سرطانی کبدی می‌باشد [۱۱].

سلول‌های بنیادی سرطانی که از بسیاری از جنبه‌ها مشابه سلول‌های بنیادی سالم می‌باشند، توانایی شروع و حفظ رشد تومور، متاستاز و مقاومت به درمان را دارا می‌باشند [۱۲]. بنابراین مطالعاتی که در زمینه و ارتباط با سلول‌های بنیادی سرطانی انجام می‌شود زمینه طراحی روش‌های درمانی در راستای مهار این سلول‌ها [۱۳-۱۵] و در نتیجه درمان سرطان را فراهم می‌کند [۱۶].

متاسفانه علی‌رغم مطالعات و کاوش‌های فراوان دانشمندان، هنوز روش و یا درمان قطعی برای بیشتر انواع سرطان‌ها منجمله کلورکتال نیافته‌اند. با توجه به اینکه روش جراحی برای درمان سرطان در مراحل پیشرفته کارایی نداشته و روش پرتودرمانی نیز عوارض جانبی فراوانی را بدنیا ل دارد بنابراین، یافتن داروهای جدید با کارایی بالا به‌عنوان روشی برای شیمی درمانی سرطان هنوز به عنوان روشی ایده‌آل و قابل توجه مطرح است. با توجه به خصوصیات کمپلکس‌های متنوعی که از لیگاندهای بازشیف و ترکیبات آلی قلع سنتز می‌گردد در این مطالعه بر آن شدیم تا خاصیت ضدتکثیری و کشندگی دو نوع لیگاند باز شیف محلول در آب حاصل از تراکم معرف گیرارد-T با ۳- متوکسی‌سالیسیل‌آلدهید (H_2L^1)، ۴- هیدروکسی‌سالیسیل‌آلدهید (H_2L^2) و کمپلکس دی‌متیل قلع (IV) بر بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی رده HT29 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

این آزمایش به صورت تجربی بر روی سلول‌های سرطانی کلون، رده HT29 در آزمایشگاه تکوینی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز در زمستان ۱۳۹۵ و با رعایت کامل آیین‌نامه‌های اخلاقی انجام شد. جامعه پژوهش رده سلولی سرطانی HT29 تهیه شده از انستیتو پاستور بود. متغیرهای مطالعه دوز و زمان مصرف ترکیبات بازشیف بود. بر اساس استاندارد برای گروه کنترل و ماده‌ی ارزیابی‌شونده حداقل سه چاهک باید تهیه شود که در پژوهش کنونی از شش چاهک استفاده شد. تمام مواد و حلال‌های مورد نیاز برای تهیه‌ی لیگاندهای باز شیف و کمپلکس‌های قلع آن‌ها بجز معرف گیرارد-T که از شرکت آکروس خریداری گردید از شرکت مرک تهیه شدند.

سنتز لیگاند باز شیف ۳- متوکسی‌سالیسیل‌آلدهید- گیرارد T هیدرازون (H2L1): جهت سنتز این لیگاند، به محلول ۰/۸۳۵ گرم (۵ میلی‌مول) گیرارد P در ۷ میلی‌لیتر متانول، به آهستگی ۰/۷۶۰ گرم (۵ میلی‌مول) ۳- متوکسی‌سالیسیل‌آلدهید حل شده در ۳ میلی‌لیتر متانول اضافه، محلول به دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه رفلاکس شد. پس از اتمام زمان رفلاکس و سرد شدن محلول واکنش در محیط رسوب سفید رنگ تشکیل شده صاف و با مقداری اتانول شسته شد. رسوب به دست آمده در محیط خشک و جهت محاسبه‌ی راندمان جمع‌آوری گردید. محصول واکنش کاملاً در آب محلول است. وزن محصول واکنش ۰/۸۶۹ گرم، نقطه ذوب ۱۱۵ °C و بازدهی واکنش ۶۰٪ می‌باشد.

سنتز لیگاند باز شیف ۴- هیدروکسی‌سالیسیل-آلدهید- گیرارد T هیدرازون (H2L2): این ترکیب مشابه ترکیب (H2L1) از ۵ میلی‌مول ۴-هیدروکسی-

سالیسیل‌آلدهید سنتز شده است. محصول واکنش کاملاً در آب محلول است. وزن محصول ۱/۳۳۸ گرم، نقطه ذوب ۲۵۰ °C و بازدهی واکنش ۹۳٪ می‌باشد.

سنتز کمپلکس [SnMe2(L1)]: به منظور سنتز کمپلکس فوق ابتدا ۱ میلی‌مول (۰/۲۸۹ گرم) از لیگاند H2L1 را در ۷ میلی‌لیتر متانول حل کرده سپس با استفاده از ۲ میلی‌مول (۰/۲۸ میلی‌لیتر) باز تری‌اتیل-آمین آن را دپروتونه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. پس از آن محلول ۱ میلی‌مول (۰/۲۲۰ گرم) دی-متیل‌دی‌کلریدقلع (IV) حل شده در ۳ میلی‌لیتر متانول به آهستگی به آن اضافه گردید. محلول واکنش به مدت ۱۲۰ دقیقه رفلاکس گردید. پس از اتمام زمان رفلاکس و تبخیر کامل حلال در دمای محیط رسوب به دست آمده جمع‌آوری و جهت حذف نمک تری-اتیل‌آمونیم کلرید با مقداری اتانول سرد و دی‌کلرومتان شسته شد و باقی مانده‌ی رسوب جهت محاسبه‌ی راندمان و شناسایی خشک و جمع‌آوری گردید. محصول واکنش کاملاً در آب محلول است. وزن محصول ۰/۴ گرم، نقطه ذوب ۱۹۸ °C و بازدهی واکنش ۸۹٪ می‌باشد.

سنتز کمپلکس [SnMe2(L2)]: کمپلکس [SnMe2(L2)] مشابه کمپلکس قبل از لیگاند باز شیف ۴- هیدروکسی‌سالیسیل‌آلدهید- گیرارد T هیدرازون تهیه شد. کمپلکس سنتز شده در آب کاملاً حل شد. وزن محصول ۰/۳۱ گرم، نقطه ذوب ۲۳۷ °C و بازدهی واکنش ۸۰٪ می‌باشد.

تهیه ترکیبات بازشیف: ترکیبات (H2L¹)، (H2L²)، [SnMe2(L¹)]، [SnMe2(L²)] با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml) در محیط کشت تهیه شدند [۱۷]. سپس نمونه‌های تهیه شده جهت حذف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر

فیلتر شدند.

انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محلول MTT خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر (Dimethyl Sulfoxide, Merck, USA, 100%) DMSO اضافه و سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Expert 96, Asys) با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Hitch, Ec Austria) اندازه‌گیری شد. برای بررسی مرگ سلولی، سلول‌های HT29 به مدت ۲۴-۲۸ ساعت با محیط‌کشت حاوی کشنده‌ترین ترکیب بازهای شیف (یعنی $\text{SnMe}_2(\text{L}_2)$) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) کشت شدند و سپس سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ (Gibco, USA) تثبیت و با استفاده از رنگ (DAPI (300 nM) رنگ‌آمیزی و سپس عکس‌برداری شدند. برای شمارش سلولی در روزهای معین، ۲۰ منطقه (با ابعاد 1mm^2) به صورت اتفاقی انتخاب و شمارش و میانگین سلولی بدست آمد. سلول‌های آپوپتوز شده با مورفولوژی هسته چروکیده، قطعه قطعه شده و با شدت فلورسانس بالا به عنوان سلول‌های آپوپتوز شده گزارش شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Minitab (Ver.18) و آزمون‌های آماری ANOVA سه طرفه و پس آزمون توکی به صورت $(\text{Mean} \pm \text{SE})$ مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام و تفاوت‌های با $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس مشاهدات مورفولوژیک رده سلول‌های سرطانی HT29 با میکروسکوپ معکوس، مشخص شد لیگاندهای بازشیف مشتق شده از معرف گیرارد-T و کمپلکس‌های دی‌متیل قلع (IV) با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب تغییرات محسوسی در شکل و

سلول‌های سرطانی رده سلولی HT29 از موسسه پاستور تهران خریداری شد. سلول‌های HT29 در محیط‌کشت DMEM-F12 (Gibco, USA) با ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) در انکوباتور با شرایط استاندارد نگهداری شدند. بعد از اینکه تراکم سلولی در فلاسک به حد ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید سلول‌ها با استفاده از ترپسین (Gibco, USA) جدا و حدود 1×10^4 cells/cm² سلول در هر چاهک از ظروف کشت (bacterial Petri dishes) ۹۶ خانه در محیط DMEM/F12 محتوی ۱۰٪ سرم و ۱٪ آنتی بیوتیک (پنی‌سیلین / استرپتومایسین) قرار داده شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (حل شده در محیط ذکر شده) از بازهای شیف و کمپلکس آنها ((H_2L^1) ، (H_2L^2) ، $[\text{SnMe}_2(\text{L}^1)]$ ، $[\text{SnMe}_2(\text{L}^2)]$) تیمار و به مدت سه روز در این شرایط نگهداری و با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus, BX51, Japan) عکس‌برداری شدند قابل ذکر است که در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط اضافه و محیط کشت سلول‌های به‌طور معمول به صورت یک روز در میان تعویض گشت. میزان بقای سلول‌های کشت داده شده با ترکیبات بازهای شیف با استفاده از 2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)3-(4, 5-di-methylthiazol-۵ mg/ml ارزیابی شد. درصد بقای سلولی در روزهای ۱، ۲ و ۳ بعد از تیمار تعیین گردید. به طور خلاصه در زمان‌های معین محیط کشت سلولی از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (Merck, Germany) اضافه شد، بعد از ۳ تا ۴ ساعت

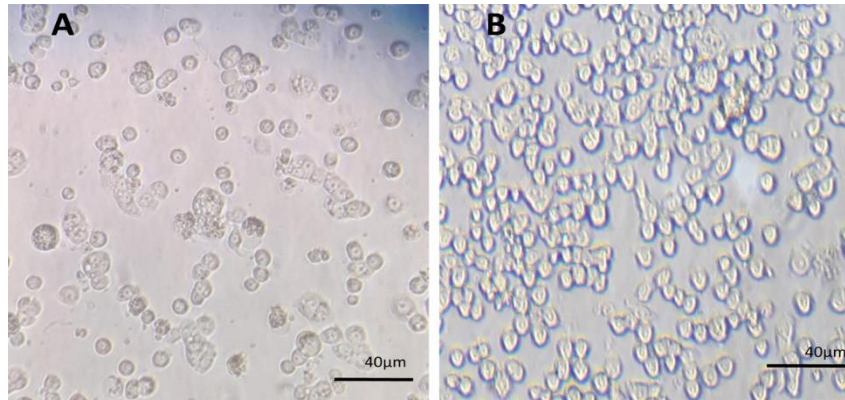
صورت معنی‌داری کاهش یافت به طوریکه بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با (H_2L^1) ، (H_2L^2) ، $[SnMe_2(L^1)]$ ، $[SnMe_2(L^2)]$ به ترتیب ۴۸، ۵۶، ۳۶، ۴۲ بود ($P < 0/05$) و برای غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۵، ۵۱، ۳۲، ۳۶ بود ($P < 0/05$) و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۹، ۴۲، ۲۵، ۲۸ بود ($P < 0/05$). و همچنین این کاهش برای هر چهار ترکیب در مقایسه با روز اول نیز معنی‌داری ($P < 0/01$) بوده است (شکل ۲). درصد زنده بودن سلولها در گروه های تیمار در روز سوم با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر چهار ترکیب مورد آزمایش نسبت به نمونه کنترل و نمونه‌های روز اول و دوم به صورت معنی‌داری ($P < 0/05$) ذکاهش یافت به طوری‌که بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با (H_2L^1) ، (H_2L^2) ، $[SnMe_2(L^1)]$ ، $[SnMe_2(L^2)]$ به ترتیب ۳۹، ۴۴، ۳۴، ۳۴ بود ($P < 0/05$) و برای غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۲، ۳۹، ۲۴، ۲۸ بود ($P < 0/05$) و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۲، ۲۹، ۱۸، ۲۲ بود ($P < 0/05$). بیشترین درصد آپتوز ۸۲٪ ($P < 0/05$) در روز سوم کمترین درصد بقا مربوط به $[SnMe_2(L_2)]$ با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که بقای سلولها را به ۱۸ درصد کاهش داد (شکل ۲).

بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های HT29 با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI و با میکروسکوپ فلئورسنت انجام گردید. برای اینکار تیمار با چهار ترکیب مورد آزمایش با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و در روز سوم انتخاب و در شکل ۳ نمایش داده شده است. چروکیدگی و افزایش اندازه واکوئل‌ها، کاهش سیتوپلاسم، پیگمانته شدن هسته و قطعه‌قطعه شدن

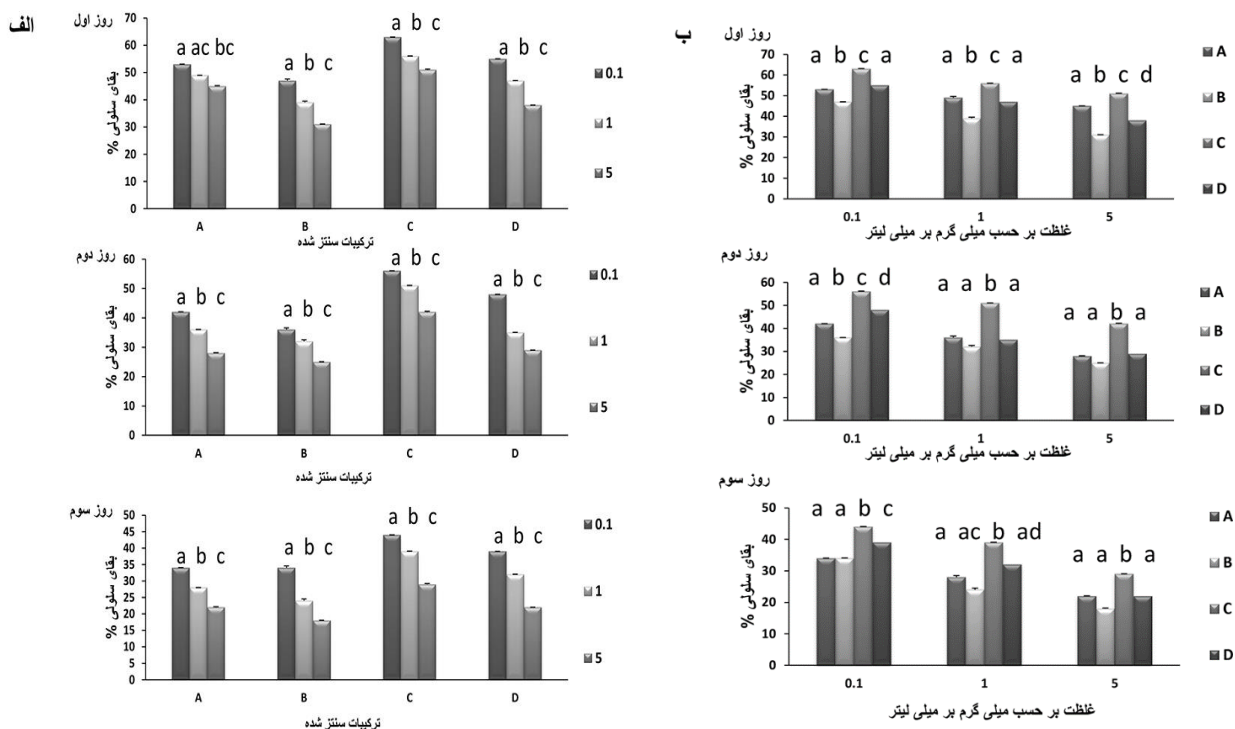
حالت سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل گردیدند. برای به تصویر کشیدن تغییرات مورفولوژیکی از میان این ترکیبات کشنده ترین ترکیب یعنی $[SnMe_2(L_2)]$ با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و در روز سوم انتخاب و مشاهده شد مرگ سلولی با تغییرات مورفولوژیک از جمله کاهش حجم سلولی و گرد شدن سلولی همراه بود و همچنین گرانولاسیون سلولی در سلول‌ها مشاهده شد (شکل 1A و 1B).

به منظور بررسی اثرات لیگاندها و کمپلکس‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HT29 از روش MTT استفاده شد و میزان بقای سلول‌ها در غلظت‌های یکسان برای گروه‌های مختلف از نظر آماری باهم مقایسه شد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، مقایسه درصد بقای سلول‌های HT29 پس از در معرض قرار گرفتن با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روز اول برای تمام ترکیبات ذکر شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد به طوریکه بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با (H_2L^1) ، (H_2L^2) ، $[SnMe_2(L^1)]$ ، $[SnMe_2(L^2)]$ به ترتیب ۵۵، ۶۳، ۴۷، ۵۳ بود ($P < 0/05$) و برای غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۴۷، ۵۶، ۳۹، ۴۹ بود ($P < 0/05$) و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۸، ۵۱، ۳۱، ۴۵ بود ($P < 0/05$). از میان چهار ترکیب آزمایش شده $[SnMe_2(L_2)]$ در هر سه غلظت ۰/۱، ۱ و ۵ در روز اول به صورت معنی‌داری ($P < 0/05$) اثر کشندگی بیشتری بر سلول‌های HT29 نسبت به سه ترکیب دیگر دارد و بقای سلول‌ها را به ترتیب به ۴۷، ۳۹ و ۳۱ درصد کاهش می‌دهد (شکل ۲). درصد زنده بودن سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ هر چهار ترکیب در روز دوم نسبت به گروه کنترل به

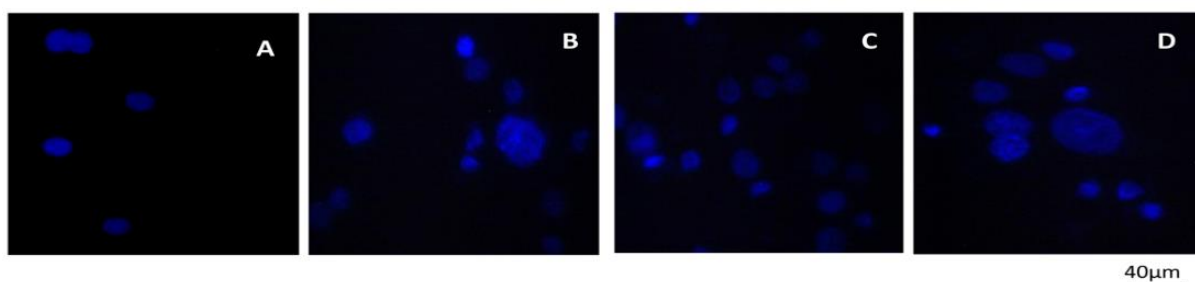
کروماتین، نشانه‌ای از تغییرات مورفولوژیک و در نتیجه نشانه‌هایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های HT29 می‌باشند که کاملاً مشهود است (شکل 3A-D).



شکل ۱- بررسی مورفولوژی سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر [SnMe₂(L²)] با استفاده از میکروسکوپ معکوس سه روز بعد از تیمار الف- سلول‌های در حال آپتوز در نمونه تیمار شده ب- نمونه کنترل



شکل ۲- اثرات غلظت‌های ترکیبات شیف باز و کمپلکس آن‌ها بر بقای و تکثیر سلول‌های HT29 با روش MTT در روزهای ۱، ۲ و ۳ بعد از تیمار. الف- در این نمودار اثر غلظت‌های متفاوت از هر کدام از ترکیبات A تا D در روزهای ۱، ۲ و ۳ مقایسه شده‌اند که حروف‌های مشابه برای هر ترکیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) غلظت‌های مختلف آن ترکیب و حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت‌های معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف آن ترکیب می‌باشد ($n=3$). ب- در این نمودار اثر ترکیبات متفاوت در هر کدام از غلظت‌های ۰.۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روزهای ۱، ۲ و ۳ باهم مقایسه شده‌اند که حروف‌های مشابه برای هر غلظت نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) ترکیب‌های مختلف در آن غلظت و حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت‌های معنی‌دار ($P < 0.05$) بین ترکیب‌های مختلف آن غلظت می‌باشد ($n=3$). ترکیبات شامل $(H_2L^1)=A$ ، $(H_2L^2)=C$ ، $[SnMe_2(L^2)] = D$ ، $=B [SnMe_2(L^1)]$.



شکل ۳- نتایج رنگ آمیزی با رنگ DAPI برای بررسی وضعیت هسته سلول‌های HT29 تیمار شده با کشنده ترین ترکیب یعنی $[SnMe_2(L^2)]$ با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طی دوره سه روزه A- نمونه کنترل که بدون تیمار است B - نمونه تیمار شده بعد از یک روز C- نمونه تیمار شده بعد از دو روز D- نمونه تیمار شده بعد از سه روز

بحث و نتیجه‌گیری

دلیل جدا شدن گروه‌های الکترونگاتیو کلر و تجمع ابر الکترونی لیگاند بر روی آن کاهش می‌یابد. در نتیجه ماهیت چربی دوستی اتم مرکزی افزایش یافته و این امر به نفوذ کمپلکس‌ها از طریق لایه پیتیدی غشاء سلول کمک می‌کند. علاوه بر این فعالیت بیشتر کمپلکس‌ها نسبت به لیگاندها را می‌توان به فعالیت بیولوژیکی ذاتی بخش آلی قلع (R_2Sn) نسبت داد. در این مطالعه قویترین اثرکشدگی مربوط به کمپلکس $[SnMe_2(L^2)]$ با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روز سوم تیمار بود.

امروزه تحقیق در مورد یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان بسیار ارزشمند و ضروری می‌باشد [۱۹]، در همین ارتباط Tashar و همکاران تعدادی کمپلکس از تری‌فنیل‌قلع (IV) با لیگاندهای باز شیف شامل آمینوآستات را سنتز و کارایی آنها در شیمی درمانی سرطان را بررسی کردند. همراستا با یافته‌های ما، نتایج *In vitro* برای چندین رده سلولی تومور انسانی (A498، EVSA-T، H226، IGROV، M19، MEL، MCF7 و WIDR) نشان داد این ترکیبات بیشترین فعالیت سایتوتوکسیک نسبت به ترکیبات گزارش شده‌ی مشابه را داشته و دارای پتانسیل کاربرد بعنوان داروی ضدسرطان را دارا می‌باشند [۲۰].

در این پژوهش سلول‌های HT29 تحت تیمار با سه غلظت مختلف از لیگاندهای بازشیف مشتق شده از معرف گیرارد-T و کمپلکس‌های دی‌متیل قلع (IV) آنها قرار گرفت و میزان رشد، تکثیر و بقای آنها بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که لیگاندهای بازشیف و کمپلکس‌های آنها می‌تواند سبب ایجاد تغییرات محسوسی در مورفولوژی سلول‌های HT29 گردد. ترکیبات مذکور سبب کاهش معنی داری در میزان بقا و تکثیر سلول‌های HT29 در مقایسه با نمونه‌های کنترل گردیدند. میزان القا مرگ سلولی بواسطه لیگاندهای بازشیف و کمپلکس‌های آنها رابطه مستقیمی با افزایش غلظت ترکیبات و طول مدت تیمار داشت. بعلاوه مطالعه آنالیز آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که ترکیبات آزمایش شده به صورت مشخصی باعث القای علائم مرگ سلولی در هسته سلول‌های HT29 می‌شوند. نتایج حاصل نشان داد ایجاد کمپلکس قلع از لیگاندهای بازشیف سبب افزایش قدرت کشندگی این ترکیبات بر سلول‌های HT29 گردید علت این مسئله را می‌توان با توجه به تئوری کی‌لیت شدن توجیه کرد. به این ترتیب که در کی‌لیت شدن، قطبیت اتم مرکزی قلع به

سرطانی بودن کمپلکس‌ها در مقایسه با لیگاند آنها افزایش یافته و ترکیب $[SnMe_2(L^2)]$ فعالیت سایتوتوکسیک بیشتری نسبت به سایر ترکیبات بر رده سلول‌های سرطانی HT29 نشان داده است. البته پیشنهاد می‌گردد برای شناسایی جزئیات دقیق‌تر، مطالعات مولکولی و فراساختاری بر روی تعداد بیشتری از رده‌های سلولی انجام گیرد.

سیاسگزاری

این مطالعه حاصل فعالیت پژوهشی نویسندگان بوده که با حمایت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

منابع

- [1] Basu Baul TS, Kehie P, Duthie A, Guchhait N, Raviprakash N, Mokhamatam RB, Englert U. 2017. Synthesis, photophysical properties and structures of organotin-Schiff bases utilizing aromatic amino acid from the chiral pool and evaluation of the biological perspective of a triphenyltin compound. *J Inorg Biochem*; 168: 76-89.
- [2] Baul TS, Basu S, de Vos D, Linden A. 2009. Amino acetate functionalized Schiff base organotin(IV) complexes as anticancer drugs: synthesis, structural characterization, and in vitro cytotoxicity studies. *Invest New Drugs*; 27(5): 419-431.
- [3] Baumann M, Krause M, Thames H, Trott K, Zips, D. 2009. Cancer stem cells and radiotherapy. *Int J Radiat Biol*; 85(5): 391-402.
- [4] Butof R, Dubrovska A, Baumann M. 2013. Clinical perspectives of cancer stem cell research in radiation oncology. *Radiother Oncol*; 108(3): 388-396.
- [5] Corvo ML, Mendo AS, Figueiredo S, Gaspar R, Larginho M, Guedes da Silva M F, Fernandes AR. 2016. Liposomes as Delivery System of a Sn(IV) Complex for Cancer Therapy. *Pharm Res*; 33(6): 1351-1358.

همچنین همسو با نتایج ما Yang و همکاران در سال ۲۰۱۶، با استفاده از روش MTT فعالیت سایتوتوکسیک بالای پنج ترکیب هیدرازونی قلع (IV) در برابر رده‌های سلولی انسانی مقاوم در برابر دارو (A549، Hela و MCF-7) را گزارش دادند [۱۷]. اخیراً نیز گروهی از محققین کمپلکس‌هایی از دی‌اورگانو قلع (IV) و لیگندهای باز شیف مشتق شده از پیریدوکسال را سنتز و فعالیت سایتوتوکسیک آنها نسبت به سلول‌های U-251، K-562، HCT-15، MCF-7 و SKLU-1 بررسی کرده‌اند [۱۸]. کمپلکس‌های قلع تهیه شده در این تحقیق مشابه ترکیبات گزارش شده به دلیل خاصیت بیولوژیکی ذاتی بخش آلی قلع فعالیت سایتوتوکسیکی بهتری نسبت به لیگندهای اولیه نشان داده‌اند و تفاوت‌های اصلی ترکیبات سنتز شده در این پژوهش با ترکیبات گزارش شده، می‌تواند ناشی از قطبیت و حلالیت بالای معرف گیرارد-T در محیط آبی باشد که خود به عنوان مزیتی مهم تلقی می‌گردد.

نتایج این تحقیق فعالیت بیشتر این ترکیبات نسبت به استاندارد رفرنس (سیس پلاتین) را نشان داده است. به طور کلی کمپلکس‌های سنتز شده با توجه به حلالیت در آب و حلال‌های آلی و بنابراین ماهیت چربی دوستی و آب دوستی توأم، کاندیدهای مناسبی برای مطالعات ضدتوموری می‌باشند. همچنین حلالیت در آب علاوه بر کاهش سمیت دارو باعث می‌شود نتیجه‌ی تست‌های انجام شده در محیط آزمایشگاه نتایج مشابهی در بدن موجود زنده داشته باشد. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، لیگندهای بازشیف و کمپلکس‌های آنها به صورت وابسته به دوز و زمان دارای خاصیت کشندگی در سلول‌های HT29 می‌باشند. همچنین خاصیت ضد

- [6] Coyne I, O'Mathuna DP, Gibson F, Shields L, Sheaf G. 2013. Interventions for promoting participation in shared decision-making for children with cancer. *Cochrane Database Syst Rev*; 6;(6):CD008970.
- [7] Demirci S, Dogan A, Turkmen NB, Telci D, Rizvanov AA, Sahin F. 2017. Schiff base-Poloxamer P85 combination demonstrates chemotherapeutic effect on prostate cancer cells in vitro. *Biomed Pharmacother*; 86: 492-501.
- [8] Duff B, Thangella VR, Creaven BS, Walsh M, Egan DA. 2012. Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol*; 689(1-3): 45-55.
- [9] Hazra S, Paul A, Sharma G, Koch B, da Silva MF, Pombeiro AJ. 2016. Sulfonated Schiff base Sn(IV) complexes as potential anticancer agents. *J Inorg Biochem*; 162: 83-95.
- [10] Kim S, Lee JH, Kang I, Hyun S, Yu J, Shin C. 2016. An Amphiphilic Peptide Induces Apoptosis Through the miR29b-p53 Pathway in Cancer Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*; 5(7): e330.
- [11] Lambert JM, Morris CQ. 2017. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review. *Adv Ther*; 34(5):1015-1035.
- [12] Malebari AM, Greene LM, Nathwani SM, Fayne D, O'Boyle NM, Wang S, Meegan MJ. 2017. beta-Lactam analogues of combretastatin A-4 prevent metabolic inactivation by glucuronidation in chemoresistant HT-29 colon cancer cells. *Eur J Med Chem*; 130: 261-285.
- [13] Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Magne N. 2012. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett*; 322(2): 139-147.
- [14] Rehman W, Yasmeen R, Rahim F, Waseem M, Guo CY, Hassan Z, Ayub K. 2016. Synthesis biological screening and molecular docking studies of some tin (IV) Schiff base adducts. *J Photochem Photobiol B*; 164: 65-72.
- [15] Sirikci G, Ancin NA, Oztas SG. 2015. Theoretical studies of organotin(IV) complexes derived from ONO-donor type schiff base ligands. *J Mol Model*; 21(9): 221.
- [16] Tavakol S, Azami M, Khoshzaban A, Ragerdi Kashani I, Tavakol B, Hoveizi E, Rezzayat Sorkhabadi SM. 2013. Effect of laminated hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold structure on osteogenesis using unrestricted somatic stem cells in rat. *Cell Biol Int*; 37(11): 1181-1189.
- [17] Untch M, Harbeck N, Huober J, von Minckwitz G, Gerber B, Kreipe HH, Loibl S. 2015. Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Geburtshilfe Frauenheilkd; 75(6): 556-565.
- [18] [18]. Wu C, Zhang J, Liu T, Jiao G, Li C, Hu B. 2016. [Astaxanthin inhibits proliferation and promotes apoptosis of A549 lung cancer cells via blocking JAK1/STAT3 pathway]. *chinese journal of cellular and molecular immunology*; 32(6): 784-788.
- [19] Zaitso M, Kawachi I, Takeuchi T, Kobayashi Y. 2017. Alcohol consumption and risk of upper-tract urothelial cancer. *Cancer Epidemiol*; 48: 36-40.
- [20] Zhao X, Cui JW, Hu JH, Gao SJ, Liu XL. 2017. Effects of low-dose radiation on adaptive response in colon cancer stem cells. *Clin Transl Oncol*; 19(7): 907-914

