

## بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته و القا آپوپتوز ترکیب شیف باز وانادیوم بر رده سلولی K562

\*مریم فخرایی<sup>۱</sup>، وحید نجاتی<sup>۲</sup>، نوروز دلیرز<sup>۳</sup>

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۶

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۰/۱۲/۳

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعات گذشته اثرات زیستی کمپلکس‌های وانادیوم را نشان داده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی خاصیت ضدتکثیر و القای آپوپتوز ترکیب جدید و سنتزی شیف باز وانادیوم بر روی رده سلولی K562 لوسمی می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** برای ارزیابی میزان سمیت ترکیب فوق پس از کشت رده سلولی K562 در محیط کشت RPMI سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵-۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) ترکیب یاد شده به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. همچنین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها با روش MTT بررسی شده است. برای بررسی اثرات توقف چرخه سلولی سلول‌ها تحت تاثیر غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از شیف-باز وانادیوم مورد مطالعه با رنگ آمیزی PI و توسط دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شده است. درصد آپوپتوز القایی به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در طی سه زمان انکوباسیون ۴۸، ۲۴، ۱۲ ساعت با استفاده از کیت Annexin-PI توسط دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شده است. همچنین آنالیز چرخه سلولی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیب شیف-باز وانادیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت نیز توسط دستگاه فلوسایتومتری سنجیده شده است. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

**یافته‌ها:** با افزایش غلظت شیف-باز اکسووانادیوم به صورت وابسته به غلظت، درصد بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد، به طوری که در غلظت‌های ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیب شیف-باز وانادیوم در مدت زمان ۴۸ ساعت میزان بقای سلول‌ها به ترتیب ۸۰، ۸۵، ۹۰ درصد می‌باشد. با در معرض قرار گرفتن سلول‌های K562 در برابر ترکیب اکسووانادیوم منجر به القای آپوپتوز به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌گردد. بیشترین درصد آپوپتوز (۳۴/۱۱٪) در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت رخ می‌دهد. که در غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این ترکیب وانادیوم سنتزی در یک دوز غیرسیتوتوکسیک اثرات القای آپوپتوز و اثرات ضدتکثیری را دارا است و می‌تواند به عنوان کاندیدایی جهت یافتن داروهای ضدسرطانی جدید مورد توجه قرار گیرد. **کلمات کلیدی:** سیتوتوکسیسیته، فلوسایتومتری، لوسمی، کمپلکس وانادیوم، MTT، آپوپتوزیس

### مقدمه

استفاده در شیمی دارویی ترکیبات آهن بودند. پذیرش کمپلکس‌های فلزی به عنوان دارو با به کارگیری کمپلکس‌هایی از پلاتین از قبیل سیس پلاتین گسترش یافت (۲، ۳).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به یافتن ترکیبات ضد سرطانی جدید حاوی یونهای فلزی شده است (۱). اولین ترکیبات فلزی مورد

۱- پژوهشگر، ایران، ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، گروه بافت شناسی و جنین شناسی (\*\*نویسنده مسئول)

تلفن: ۰۱۹۲۵۲۱۹۹۷۰ آدرس الکترونیک: maryamfakhrai@yahoo.com

۲- استادیار، ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم

۳- استادیار، ایران، ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی

ترکیب جدید شیف باز اکسو و انادیوم « ۱ و ۳- دی آمینو پروپان و انادیوم (استیل استات) سالیس آلدهید»، اقدام به بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته و القا آپوپتوز ترکیب یاد شده، گردید.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت یک بررسی تجربی در پژوهشکده زیست و فناوری ارومیه انجام گرفت. مطالعه مزبور به مدت ۱۰ ماه از آذر ماه ۱۳۸۸ لغایت مهر ۱۳۸۹ به طول انجامید. ترکیب شیف باز اکسو و انادیوم مورد مطالعه « ۱ و ۳- دی آمینو پروپان و انادیوم (استیل استات) سالیس آلدهید (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) » می باشد که در بخش شیمی دانشگاه سمنان سنتز شده بود. مواد مورد نیاز در این تحقیق از جمله DMSO, MTT, PBS, RNase, FBS, از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شدند. همچنین کیت Annexin-v-PI جهت سنجش آپوپتوز القا شده از شرکت Gibco (آمریکا) خریداری شد. کشت سلول: رده سلولی مطالعه شده K562 (Human leukemia cell line) بود، که از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI دارای ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FBS) و محیط کشت شامل انسولین ۰/۱٪ واحد بر میلی لیتر L - گلوتامین ۰/۳ گرم، سدیم پیروات ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و آنتی بیوتیک‌ها شامل ۵۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت و پاساژ داده شدند. شمارش سلولی با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵٪ بود.

ارزیابی سایتوتوکسیسیته سلولی شیف باز و انادیوم مورد مطالعه: به منظور سنجش اثر سایتوتوکسیسیته سلولی این شیف باز از روش ۲،۵- (۲-yl)-Dimethylthiazol-۴،۵- (۳- MTT assay (diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان (Formazan) نامحلول بنا شده است (۲۵). ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۵۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های لگاریتمی ترکیب شیف- باز مورد مطالعه حل شده در DMSO (غلظت نهایی DMSO در محیط

شیف بازها ترکیبات ماکروسیکلی هستند که توسط واکنش‌ها تراکمی تشکیل می‌شوند. شیف باز مورد مطالعه عموماً لیگاند چهاردندانه (حاوی ۲ اتم نیتروژن و ۲ اتم اکسیژن) و در مواقعی ۵ دندانه می‌باشد. حداقل ۲ اتم از اتم‌های کئوردینه شده در این لیگاندها اتم‌های نیتروژن هستند، اتم‌های کئوردینه دیگر می‌توانند نیتروژن، اکسیژن، گوگرد و یا ترکیبی از هر سه باشند (۴). سالن‌ها از واکنش سالیسیل آلدهید با استخلاف‌های گوناگون بر روی حلقه بنزن و دی‌آمین مورد نظر تهیه می‌شوند (۵). کمپلکس‌های فلزی به طور عمده با اتصال عامل سیتوتوکسیک به یون فلزی به طور مؤثری دارو را به محل مورد نظر حمل می‌نمایند. کمپلکس‌هایی با لیگاند سالن حاوی منگنز، کبالت و مس تهیه شده‌اند که اتصال این کمپلکس‌ها به DNA و شکسته شدن DNA توسط این کمپلکس‌ها به اثبات رسیده است (۶).

در این مطالعه اثر کمپلکسی با لیگاند و انادیوم بر روی رده سلولی K562 مورد مطالعه قرار گرفت. این رده سلولی جدا شده از نوعی سرطان خون به نام CML می‌باشد بیشتر مبتلایان به این سرطان دچار جهش یا تغییر ژنتیکی موسوم به کروموزوم فیلادلفیا هستند (۷). ترکیبات فلز کمیاب و انادیوم به صورت گسترده در سطح زمین توزیع شده‌اند (۸). این ترکیبات به عنوان مواد ریز مغذی برای گونه‌هایی از جانوران مطرح شده‌اند (۹، ۱۰). هر چند که نقش این عنصر به عنوان یک ترکیب ضروری در انسان به اثبات نرسیده است (۱۱، ۱۲). اولین بار اثرات ضد سرطانی و انادیوم در مطالعه‌ای بر روی سرطان پستان القا شده در رت در سال ۱۹۸۴ مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳). به نحو جالب توجهی سرطان القا شده در رت با تغذیه روزانه رژیم غذایی حاوی ۲۵ mg/L VOSO<sub>4</sub> مورد پیشگیری قرار گرفت (۱۴). مطالعات بعدی اثربخشی ترکیبات و انادیوم را بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسان از قبیل سرطان کبد (۱۵)، سرطان سینه (۱۶، ۱۷)، لوسمی (۱۸)، کلیه (۱۹)، تخمدان (۲۰)، بیضه (۲۱) و سلول‌های اپیتلیال (۲۲) نشان دادند.

کمپلکس‌های مختلف و انادیوم دارای اثرات ضد سرطانی بیشتری در شرایط *in vitro* و *in vivo* نسبت به نمک‌های چهار و پنج ظرفیتی و انادیوم دارا می‌باشند (۲۳). اکثر داروهای شیمی‌درمانی منجر به القای آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های توموری می‌شوند (۲۴). در این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد توموری

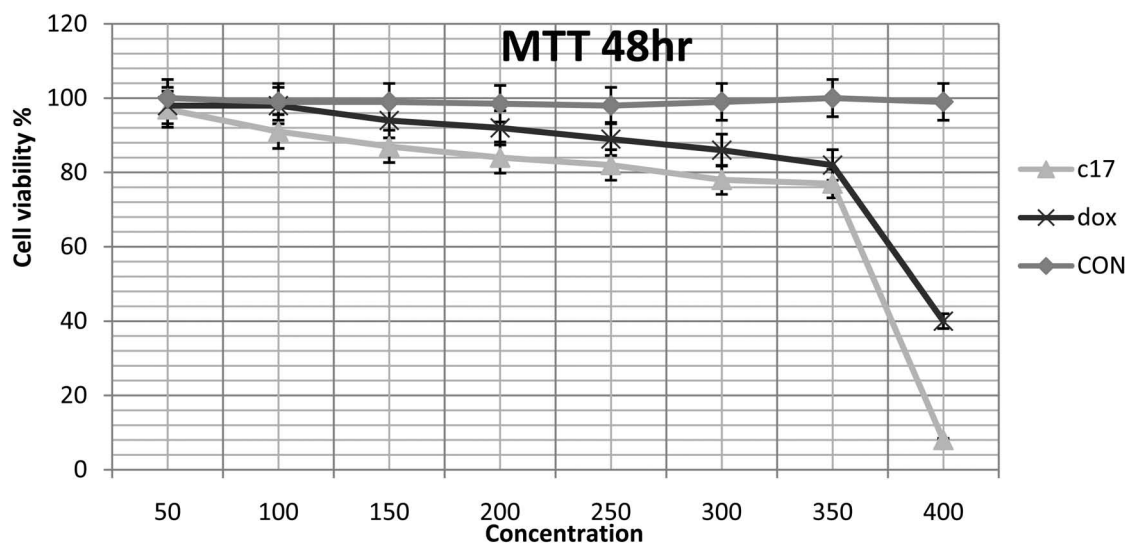
بررسی آپوپتوز ناشی از شیف باز وانادیوم به وسیله کیت

#### Annexin-PI

ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی معادل  $5 \times 10^5$  سلول در میلی لیتر در پلیت‌های ۶ خانه‌ای ریخته و مقدار ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل به همراه ۱۰٪ FBS به چاهک‌ها اضافه گردید. در ادامه ترکیب شیف - باز وانادیوم مورد مطالعه با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به چاهک‌ها اضافه گشت. سلول‌ها در سه زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ابتدا کف پلیت‌های ۶ خانه را با  $2 \text{ ml PBS}$  شستشو داده و سپس  $2000 \text{ rpm/min}$  سانتریفیوژ شد. مایع روی نمونه‌ها دور ریخته شد و سپس به مقدار ۱۰ میکرولیتر Annexin اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد. پس از گذشت این زمان مقدار  $1 \text{ ml PBS}$  به نمونه‌ها اضافه و به سرعت نمونه‌ها به وسیله دستگاه فلو سایتومتری ارزیابی گردید.

ه آنالیز آماری: در تمامی مراحل هر آزمون سه بار تکرار شد و داده‌های به دست آمده به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance) (ANOVA؛ نرم افزار SPSS نسخه ۱۷) و آزمون توکی (Tukey's Test) (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی دار

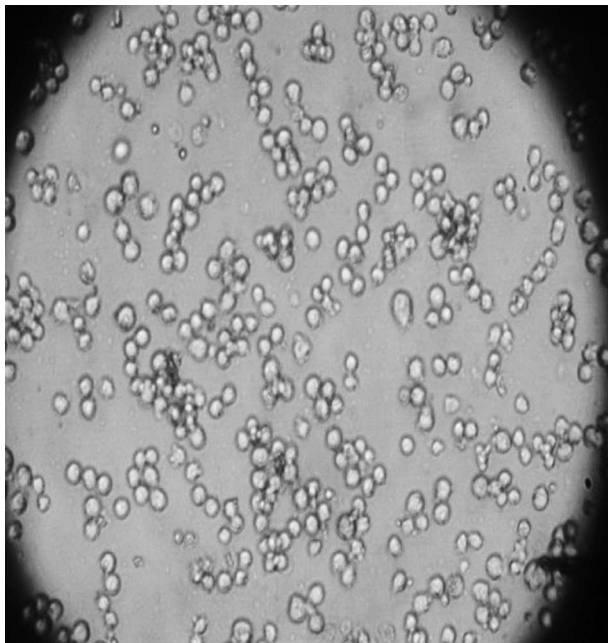
کشت در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۱/۰ درصد بود) به چاهک‌ها اضافه گشت. بدین ترتیب رقت نهایی در چاهک‌ها بین ۴۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم شد (در نمودار مربوط به MTT همه رقت‌ها نشان داده شده است). هر رقت در سه چاهک از پلیت سنچش گردید و برای هر رقت سه بار تکرار در نظر گرفته شد. همچنین سه چاهک شامل سلول و محیط کشت کامل به صورت کنترل در نظر گرفته شد؛ و در سه چاهک از داروی کنترل مثبت داگسوروبیسین برای مقایسه با شیف باز مورد نظر استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵٪  $\text{CO}_2$  و ۹۵٪ رطوبت انکوبه شدند. پس از پایان زمان‌های انکوباسیون مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) به چاهک‌ها اضافه کرده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون کریستال‌های رنگ فورمازان ایجاد شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شد. شدت رنگ توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر ثبت گردید. برای کنترل‌ها از محیط کشت فاقد سلول به عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر و از محیط کشت همراه سلول بدون دارو به عنوان کنترل سلول زنده استفاده شد.  $\text{IC}_{50}$  (غلظتی از دارو است که ۵۰٪ رشد سلول را نسبت به کنترل کاهش می‌دهد) که از طریق رگرسیون غیرخطی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت مشتقات محاسبه شد.



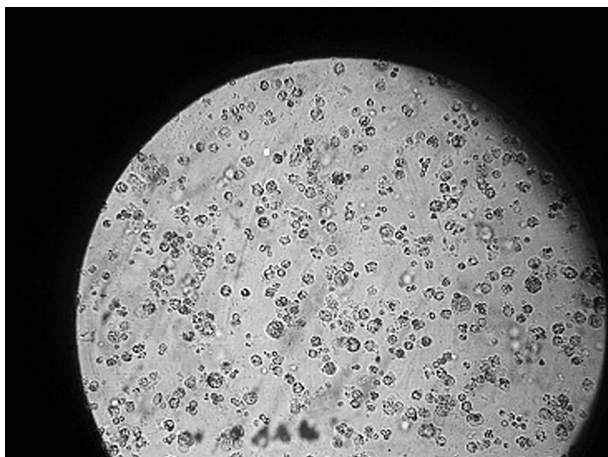
نمودار ۱- مقایسه درصد میانگین سلول‌های زنده K562 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات ۱ و ۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) سالیس آلدهید ( $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{V}$ ) و دوگسوروبیسین به عنوان داروی بدون اثر دارو به عنوان کنترل بعد از ۴۸ ساعت.

و مقایسه آن با سلول‌های اثر داده شده با ترکیب شیف باز و انادیوم شکل (۲) به کمک میکروسکوپ Invert (با بزرگنمایی ۴۰۰): این بررسی نشان می‌دهد که با گذشت زمان در معرض قرار گرفتن با این ترکیب میزان سلول‌های زنده که شفاف می‌باشند کاهش می‌یابد و سلول‌های آپوپتوز شده نیز در شکل (۲) دیده می‌شوند. (شکل ۱، ۲)

نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز سلول‌های اثر داده شده با کیت Annexin-PI توسط دستگاه فلوسایتومتری: در طی مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا سلول منتقل می‌شود که Annexin به فسفاتیدیل



شکل ۱



شکل ۲

آزمون‌ها  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

## یافته‌ها

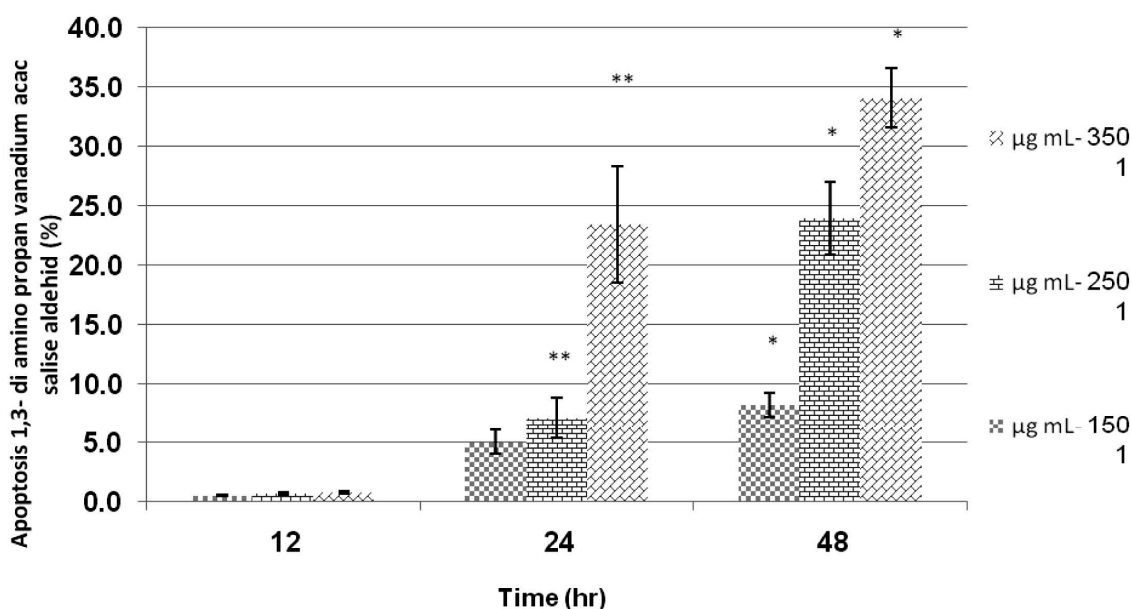
نتایج حاصل از بررسی اثر سایتوتوکسیسیته ترکیب سنتزی و انادیوم بر روی K562 به روش MTT assay: اساس این روش بر مبنای تبدیل نمک تترازولیم محلول به فورمازان نامحلول توسط میتوکندری سلول‌های زنده می‌باشد که رسوب حاصل ارغوانی رنگ است. شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا ریدر در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلول‌های زنده در چاهک‌ها با میزان OD یا جذب نوری سوسپانسیون سلولی در ارتباط است.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان حیات سلول‌های K562 در محدوده غلظت‌های ۲۵-۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر کمپلکس و انادیوم پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مرگ و میر سلول‌ها ندارد ولی از آن زمان به بعد سلول‌ها دچار مرگ و میر می‌شوند. در غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰  $\mu\text{g/ml}$  میزان بقای سلول‌ها تا ۴۸ ساعت به ترتیب ۹۰٪، ۸۵٪ و ۸۰٪ می‌رسد. پس از آن میزان بقا سلول‌ها به صورت لگاریتمی کاهش می‌یابد. به‌أطوری که میزان بقا سلول‌ها به ۵۰٪ در غلظت ۳۸۰  $\mu\text{g/ml}$  و در غلظت ۴۰۰  $\mu\text{g/ml}$  تنها به ۳۰ درصد خواهد رسید. بنا بر این کمپلکس شیف باز و انادیوم مورد مطالعه تا غلظت‌های ۳۵۰  $\mu\text{g/ml}$  فاقد اثرات سیتوتوکسیک در *in vitro* می‌باشد.

دوگسورویسین نیز تا غلظت ۳۵۰  $\mu\text{g/ml}$  الگوی تغییرات مشابهی را نشان می‌دهد و لی در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، کمپلکس شیف باز و انادیوم، موجب کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده می‌گردد.

OD/کنترل/ نمونه - ۱ = درصد بقا یا زنده ماندن سلول در این مطالعه نشان داده شده است که ترکیب شیف باز و انادیوم مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک با ۱۵۰  $\mu\text{g/ml}$  معادل ۳۶۰ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشند و ۱۵۰  $\mu\text{g/ml}$  برای دوگسورویسین ۳۷۵ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد.

بررسی مورفولوژی سلول‌های K562 در محیط کشت RPMI بدون اثر ترکیب و انادیوم (کنترل) با ترکیب شیف باز و انادیوم شکل (۱)



نمودار ۲- میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده‌ی K562 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ۱ و ۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) سالیس آلدهید (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>V) (p<0/05), \*\*, \*

به وضوح نشان داده‌اند که کمپلکس وانادیوم مذکور تا غلظت ۳۵۰ µg/ml دارای اثرات مشخص سیتوتوکسیک در *in vitro* نمی‌باشد. با افزایش غلظت کمپلکس وانادیوم مورد مطالعه به بالای غلظت ۳۵۰ µg/ml حیات سلول‌ها به صورت لگاریتمی کاهش می‌یابد. برای مطالعات بیشتر اثرات ذاتی ضد سرطانی کمپلکس وانادیوم مذکور، مطالعات بیشتری با استفاده از غلظت‌های غیر سیتوتوکسیک (۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ µg/ml) طراحی گردید.

در ادامه برای مطالعات بیشتر شیوه مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) از آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج ما مشخص نمود که درصد سلول‌های آپپتوتیک (آنکسین مثبت و PI منفی) با افزایش غلظت و مدت زمان انکوباسیون، افزایش می‌یابد. بر طبق این نتایج، با افزایش غلظت از ۱۵۰ µg/ml به ۳۵۰ µg/ml و انکوباسیون از ۱۲ ساعت به ۴۸ ساعت، درصد آپوپتوز به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بیشترین درصد آپوپتوز القا شده در بالاترین دوز غیر سیتوتوکسیک (۳۵۰ µg/ml) پس از ۴۸ ساعت تیمار ۳۴/۱۱ درصد بوده است. آپوپتوز به عنوان مرگ برنامه ریزی شده سلولی نیز خوانده می‌شود. در صورتی که این فرآیند دچار اختلال گردد، باعث ایجاد شرایط پاتولوژیکی، از قبیل سرطان، اختلال‌های خود ایمن می‌گردد. برعکس افزایش غیر طبیعی آپوپتوز در اختلال خود ایمن نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود (۲۷-۳۰). بر خلاف آپوپتوز،

سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص می‌باشد. در نمودار (۲) درصد آپوپتوز سلول‌هایی را که در معرض شیف باز وانادیوم قرار داده شده است را نشان می‌دهد. که در سه زمان ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت می‌باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضدتوموری و القا آپوپتوز ترکیبی از شیف- باز وانادیوم C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>V " ۱ و ۳- دی آمینو پروپان وانادیوم استیل استات سالیس آلدهید می‌باشد. شدت رنگ ایجاد شده در روش MTT با سلول‌هایی دارای میتوکندری فعال می‌باشد، متناسب است. در واقع این روش برای تعیین میزان تکثیر و بقا سلول‌ها بعد از قرار گرفتن در معرض مواد سیتوتوکسیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶).

نتایج حاصل از MTT نشان می‌دهد که بقا سلول‌های K562 وابسته به غلظت کمپلکس وانادیوم می‌باشد. به طوری که غلظت‌های بالاتر از کمپلکس وانادیوم مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این ترکیب می‌باشد. بررسی‌ها

اکسیژن و رهایش سیتوکروم C از میتوکندری‌های می‌گردد. سیتوکروم C موجب آغاز آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی می‌شوند (۳۶). همچنین مطالعات روی رده‌های مختلف سلولی نشان می‌دهد که وانادیم اثرات ضد توموری خود را از طریق ممانعت تیروزین فسفاتاز سلولی یا بر اثر فعال سازی تیروزین کینازها اعمال می‌کند. این اثرات خود منجر به فعال سازی مسیرهای انتقال سیگنال می‌شوند که در نهایت منجر به آپوپتوز یا فعال سازی ژن متوقف کننده تومور می‌شوند (۳۷). مطالعات اخیر همچنین نشان می‌دهد که نمک‌های وانادیوم باعث القا آپوپتوز بر روی سلول‌های اپی درم موش از طریق تولید پراکسید هیدروژن و سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق فعال سازی ژن P53 می‌گردد (۲۲). P53 یک ژن سرکوبگر چرخه سلولی و تنظیم کننده تعمیر DNA و آپوپتوز می‌باشد (۳۸). در نهایت به نظر می‌رسد که ترکیب یاد شده دارای اثرات ضد تکثیری می‌باشد و باعث القای آپوپتوز نیز می‌شود؛ و با توجه به سنتزی بودن آن می‌توان مطالعات بیشتری به عنوان دارویی با خواص ضدسرطانی بر روی آن انجام داد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مسئولین پژوهشکده زیست فناوری ارومیه و آقایان جاهد و حسینی فر که در اجرای این پایان نامه آن‌ها را حمایت کردند، قدردانی می‌نمایند.

نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده و در طی آسیب‌های شدید به سلول از قبیل: هیپوکسی، هایپرترمی و سموم خارجی، این نوع مرگ سلولی رخ می‌دهد (۳۱، ۳۲).

روش‌های رادیوترایی، شیمی درمانی و هورمون درمانی همگی موجب القا فرآیند آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند. البته به کار بردن در دوزهای بیشتر از این ترکیبات موجب مرگ سلول سرطانی از طریق سایر روش‌ها می‌شود (۳۳).

در معرض قرار گرفتن سلول‌های MCFV با آمونیوم مونوانادات منجر به القا آپوپتوز وابسته به غلظت می‌شود. بیشترین درصد آپوپتوز در این سلول‌ها در بالاترین غلظت غیر سایتوتوکسیک آن ( $250 \mu\text{M}$ ) در حدود  $42/5\%$  بوده است (۱۶، ۱۷). همچنین ترکیبات وانادیوم باعث القا آپوپتوز در سرطان بیضه شده است (۲۱). مطالعات گذشته نشان می‌دهند که ترکیبات وانادیوم به طور معنی‌داری از تکثیر سلول‌های HEPG2 هپاتوما‌ی انسانی جلوگیری می‌کنند. اما این ترکیبات دارای اثرات ناچیزی بر سلول‌های طبیعی کبد می‌باشند (۳۴).

عمده داروهای شیمی درمانی، استرس‌های ژنوتوکسیک و سایر عوامل محرک مرگ سلولی موجب القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی یا میتوکندری می‌گردد (۳۵). در مطالعات گذشته مشخص شده است که ترکیبات وانادیوم مانند  $\text{VO}(\text{acac})_2$  می‌تواند منجر به اختلال در فعالیت میتوکندری‌ها به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌گردد. به علاوه ترکیبات وانادیوم منجر به تولید رادیکال‌های آزاد

### References

- Meshkini A, Yazdanparast R. Chemosensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. *Exp Mol Pathol* 2010; 89(3): 334-42.
- Sherman SE, Gibson D, Wang AH, Lippard SJ. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(pGpG))]. *Science* 1985; 230(4724): 412-7.
- Köpf-Maier P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; 47(1): 1-16.
- Jones RD, Summerville DA, Basolo F. Synthetic oxygen carriers related to biological systems. *Chem Rev* 1979; 79(2): 139-79.
- Yilmaz VT, Degirmencioglu I, Andac O, Karabocek S, Slawin AMZ. Synthesis, spectra and crystal structure of 2-([3-(methyl {3-[(2-hydroxybenzylidene) amino] propyl} amino) propyl] imino) methyl phenol copper (II) complex. *J Mol Struct* 2003; 654(1): 125-9.
- Failes TW, Hambley TW. Towards bioelectrochemically activated prodrugs: Fe(III) complexes of hydroxamic acids and the MMP inhibitor marimastat. *J Inorg Biochem* 2007; 101(3): 396-403.
- Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, Gualandi L, Mischiati C, Bergamini P, et al. Induction of erythroid differentiation of human K562 cells by cisplatin analogs. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(1): 31-40.
- Sorensen M, Schins RP, Hertel O, Loft S. Transition metals in personal samples of PM<sub>2.5</sub> and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5): 1340-3.
- Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, et al. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* 2001; 57(5): 633-42.

- 191
- 10- Sakurai H, Katoh A, Yoshikawa Y. Chemistry and biochemistry of insulin-mimetic vanadium and zinc complexes. Trial for treatment of diabetes mellitus. *B Chem Soc JPN* 2006; 79(11): 1645-64.
  - 11- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42(3): 249-65.
  - 12- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium--an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett* 2004; 150(2): 135-43.
  - 13- Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD. Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984; 5(6): 849-51.
  - 14- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48(17): 4827-33.
  - 15- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11(2): 95-103.
  - 16- 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(1): 13-23.
  - 17- Ray RS, Rana B, Swami B, Venu V, Chatterjee M. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chem Biol Interact* 2006; 163(3): 239-47.
  - 18- Djordjevic C, Vuletic N, Renslo ML, Puryear BC, Alimard R. Peroxo heteroligand vanadates(V): synthesis, spectro-structure relationships, and stability toward decomposition. *Mol Cell Biochem* 1995; 153(1-2): 25-9.
  - 19- Noblia P, Vieites M, Parajon-Costa BS, Baran EJ, Cerecetto H, Draper P, et al. Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [VVO<sub>2</sub>(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. *J Inorg Biochem* 2005; 99(2): 443-51.
  - 20- Itkes AV, Imamova LR, Alexandrova NM, Favorova OO, Kisselev LL. Expression of c-myc gene in human ovary carcinoma cells treated with vanadate. *Exp Cell Res* 1990; 188(1): 169-71.
  - 21- Ghosh P, D'Cruz OJ, Narla RK, Uckun FM. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(4): 1536-45.
  - 22- Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, et al. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275(42): 32516-22.
  - 23- 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(1): 9-15.
  - 24- Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Jia S, et al. Discovery of 4-aryl-4 H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based high-throughput screening assay. 2. Structure-activity relationships of the 7-and 5-, 6-, 8-positions. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(21): 4745-51.
  - 25- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267(5203): 1445-9.
  - 26- Chan SY, Hilchie AL, Brown MG, Anderson R, Hoskin DW. Apoptosis induced by intracellular ceramide accumulation in MDA-MB-435 breast carcinoma cells is dependent on the generation of reactive oxygen species. *Exp Mol Pathol* 2007; 82(1): 1-11.
  - 27- Macdonald FD, Ford CHJ, Casson AG. *Molecular biology of cancer*. 2nd ed / F. Macdonald, C.H.J. Ford, A.G. Casson. London: BIOS Scientific; 2004.
  - 28- Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181(3): 195-213.
  - 29- Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341(8855): 1251-4.
  - 30- Gougeon ML, Montagnier L. Apoptosis in AIDS. *Science* 1993; 260(5112): 1269-70.
  - 31- Wilkinson G, Stone FGA, Abel EW. *Comprehensive organometallic chemistry: the synthesis, reactions and structures of organometallic compounds*. Oxford: Pergamon; 1982.
  - 32- Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* 1991; 201: 477-82.
  - 33- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11(2): 95-103.
  - 34- Wang Q, Liu TT, Fu Y, Wang K, Yang XG. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. *J Biol Inorg Chem* 2010; 15(7): 1087-97.
  - 35- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, et al. Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a New Series of Apoptosis Inducers Using a Cell-and Caspase-Based High-Throughput Screening Assay. 3. Structure-Activity Relationships of Fused Rings at the 7, 8-Positions. *J Med Chem* 2007; 50(12): 2858-64.
  - 36- Zhao Y, Ye L, Liu H, Xia Q, Zhang Y, Yang X, et al. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2010; 104(4): 371-8.
  - 37- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42(3): 249-65.
  - 38- Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis NJ. Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. *Anticancer Res* 2000; 20(5B): 3555-64.

## Vanadium Schiff base compound mediated apoptosis and cytotoxicity effects in K562 cell line

\*Maryam Fakhraei<sup>1</sup>, Vahid Nejadi<sup>2</sup>, Norooz Delirazh<sup>3</sup>

Received: 22 Feb 2012

Accepted: 6 Aug 2012

### Abstract

**Background:** Previous studies revealed that Vanadium complexes exhibit interesting biological properties. The goal of this study was to examine the antiproliferative and apoptosis induction virtue of some newly synthesized Schiff-base of vanadium (VOL Complex: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>V and C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>V) on K562 leukemia cells.

**Materials and Methods:** In this experimental study, the leukemia cells were cultured in RPMI medium in 25 and 400 µg/L concentration and they were incubated for 48 hours. The vital activity of cells was assessed by MTT method. Apoptosis induction percentage was measured in 12, 24 and 48 hours after encountering with 150, 250 and 350 µg/L concentrations of VOL Complex by Annexin-PI kit and flow cytometry Cell cycle analysis was performed in the 150 µg/L concentration at 24 hours with flow cytometry.

**Results:** The MTT results showed that the K562 cells viability were sensitive to VOL complex in a concentration-dependent manner. With increase in Schiff-base of vanadium concentration the survival percentages of K562 leukemia cells were decreased to 90, 85 and 80 percent. Encountering cells with VLO complex caused to induce apoptosis in relation with time and concentration. The highest apoptosis (34.11 percent) was happened in 350 µg/ml at 48 hours.

**Conclusion:** This finding indicated that VOL complex, even in noncytotoxic dose, have just an apoptotic inducing effect and capable of arresting the affected cell in Go/G1 phase of cell cycle.

**Keywords:** Apoptosis, MTT, Cell cycle, flow cytometry, leukemia, VOL complexes

1- (\*Correspondence Author) Researcher, Histology and Embryology Department, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. Tel: +98 1925219970 Fax: +98192-5219970 E-mail: maryamfakhrai@yahoo.com

2- Assistant Professor, Histology and Embryology Department, Faculty of Science, Urmia University of Medical Sciences, Urumia, Iran

3- Assistant Professor, Immunology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran