



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

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

مأنده 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

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

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۴۴۱۰۲۱-۲۲ khaleghian.ali@gmail.com

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 سلولی MKN45 به عنوان نماینده سلول‌های سرطان معده کشت داده شد. سپس، برای به دست آوردن IC50(The half maximal inhibitory concentration) ترکیبات سنتزی وانادیوم از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جهت تست (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) MTT 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 سلول‌های MKN45 کاهش و خاصیت خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها افزایش یافت. دوز موثر برای IC50 سلول‌های MKN45، دوز ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیبات وانادیوم با غلظت ۱ μg/ml به صورت وابسته به زمان باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های سرطانی شده که تایید کننده آن تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی تحت تیمار با ترکیبات وانادیوم می‌باشد. همچنین بررسی قدرت تهاجم سلول‌های تیمار شده نشان داد که در غلظت ۱ μg/ml 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 سلول‌های MKN45 شوند و شرایط افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها را ایجاد کنند.

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

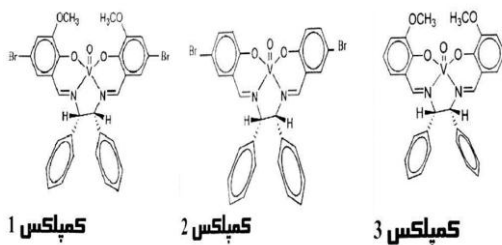
مقدمه

عامل مرگ و میر در جهان است [۱]. سرطان معده عموماً از یک زخم یا پپتیک 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 نهایتاً 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

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 هلیکوباکتر پیلوری و یا هر عاملی در سبک زندگی و تغذیه که موجب ایجاد التهاب مزمن در معده شود. سرطان معده چهارمین سرطان رایج و دومین

تفاوت ترکیبات مورد استفاده در این پژوهش در استخلاف‌های گروه آلدهید کمپلکس‌هاست، به این 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 DPPH و FRAP و تست سنجش سمیت سلولی MTT، مهاجرت سلولی (Migration) و القای آپوپتوزیس استفاده شد. شکل ۱. 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 ساختار آن‌ها در (شکل ۱) آمده است از پارتمان شیمی دانشگاه سمنان تهیه شد [۱۳]. ابتدا یک استوک اولیه غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال (Dimethyl sulfoxide) DMSO از هر کدام از کمپلکس‌ها تهیه 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 ترکیبات شیمیایی 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

تا درمان‌هایی که طی پژوهش‌های 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 سلول‌های سالم داشته باشند تا بتوانند کمک‌کننده یا جایگزینی در کنار درمان‌های استاندارد برای تسریع در بهبود بیماران باشند [۳]. از جمله این ترکیباتی‌توان 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 واسه 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 (۳-) تا (۵+) دارد که به راحتی قابل تبدیل شدن به هم هستند. اما دو فرم رایج که پایداری بیش‌تری در شرایط فیزیولوژیک 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 مانند PTPase، ATPase و امثال آن‌ها را فعال و یا غیر فعال کند و از این طریق بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند بیان ژن‌ها، مسیرهای سیگنالینگ، رشد و تکثیر سلول‌ها، مرگ سلولی، 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 لقا شده در ۱۹۸۴ مورد بررسی قرار گرفت [۹]. مشاهدات نشان داده است که ترکیبات وانادیوم در قطعه قطعه شدن DNA، توقف سیکل سلولی و لیوپراکسیداسیون 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].

کشت سلولی: ابتدا به محیط کشت RPMI Gibco ۱۰٪ از آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتوماسین و ۲۰٪ از سرم جنین گاو (FBS) افزوده شد. برای کشت سلول های MKN45 را به همراه محیط کشت RPMI ۱۰٪ در فلاسک T25 ریخته و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و در اکسید کربن (CO₂) ۵٪ قرار داده شد تا سلول ها به حد نصاب برسند. FBS باید قبل از استفاده از نظر کمپلمان غیر فعال شده باشد که برای این کار ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در تمامی آزمون ها ابتدا در صد سلول های زنده با رنگتزی پیلو تعیین شد که باید همواره بالای ۸۵٪ باشد.

بررسی سیتوتوکسیسیته سلولی شیف باز و انادایوم مورد مطالعه: تست MTT: به منظور ارزیابی وضعیت سلول ها در محیط کشت، میزان بقاء، بررسی وضعیت سلول ها بعد از تیمارهای مختلف و بررسی سیتوتوکسیسیته شیف بازهای و انادایوم بر سلول های MKN45 (از روش 4,5- (3- MTT assay - Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. در این روش میزان نمک تترازولیوم (Tetrazolium) محلول (زرد رنگ) است که توسط آنتی اکسیدان ها کاهش می یابد و در نتیجه جذب کاهش می یابد و شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه گیری است. اثر آنتی اکسیدانی با از بین رفتن رادیکال DPPH در نمونه متناسب است [۱۷].

مقدار ۵۰ ماکرومولار از غلظت های مختلف هریک از نمونه ها را با ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۴٪ از DPPH 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.

تست (Ferric reducing ability of plasma) FRAP: این روش سنجش کلی محتوی آنتی اکسیدانی ترکیبات است که بر اساس احیای آهن سه ظرفیتی فریک (Fe³⁺) توسط آنتی اکسیدان ها به آهن دو ظرفیتی فرو (Fe²⁺) آبی رنگ در محیط اسیدی پایه گذاری شده است و تغییرات رنگ و در نتیجه تغییرات جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار می گیرد [۱۸].

۱ ml از هر نمونه را با ۲/۵ ml بافر فسفات ترکیب کرده سپس ۲/۵ ml پتاسیم فری سیانید ۱٪ (۱۰ mg/ml) را اضافه کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد 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 rpm سانتریفیوژ 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 ۱٪ را اضافه کرده و جذب را با اسپکتروفتومتر در ۷۰۰ nm بررسی شد.

بررسی مورفولوژی سلول ها: به منظور بررسی مورفولوژی سلول های MKN45 ابتدا سلول ها به مدت ۲۴ ساعت فلاسک های T25 کشت داده شدند سپس به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول های تیمار نشده و تیمار شده با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر از کمپلکس های و انادایوم برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ از آن ها تصویر تهیه شد.

پژوهش مواد آسکوربیک اسید (VitC)، ۵-Fluorouracil (5-FU) از شرکت Sigma، سلول های MKN45 نمایندگی سلول های سرطان معده از انیستیتو پاستور ایران، محیط کشت RPMI Gibco (Phosphate-buffered saline) PBS، تریپسین، DMSO، رنگ 4,5-MTT-3-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide، رنگ اتیدیوم بروماید و اکریدین ارنج از شرکت Sigma تهیه شد.

تست های آنتی اکسیدانی: برای انجام تست های آنتی اکسیدانی ابتدا غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از هر کمپلکس های و انادایوم و ویتامین C (VitC) در حلال مورد نیاز تهیه شد.

تست (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)-DPPH

یک رادیکال آزاد پایدار با رنگ بنفش و دارای بیشینه جذب در طول موج ۵۱۵-۵۲۰ نانومتر است. رادیکال DPPH وقتی با آنتی اکسیدان هایی که دهنده هیدروژن می باشند واکنش می دهد رنگ محلول از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب کاهش می یابد و شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه گیری است. اثر آنتی اکسیدانی با از بین رفتن رادیکال DPPH در نمونه متناسب است [۱۷].

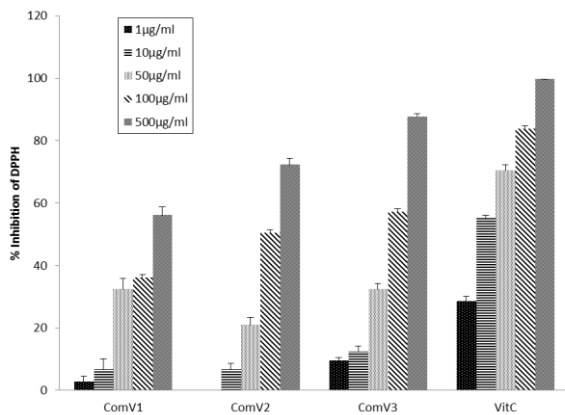
مقدار ۵۰ ماکرومولار از غلظت های مختلف هریک از نمونه ها را با ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۴٪ از DPPH ترکیب شد و پس از ورتکس کردن برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده و در نهایت جذب نوری هر یک را در ۵۱۷ نانومتر بررسی شد.

تست (Ferric reducing ability of plasma) FRAP: این روش سنجش کلی محتوی آنتی اکسیدانی ترکیبات است که بر اساس احیای آهن سه ظرفیتی فریک (Fe³⁺) توسط آنتی اکسیدان ها به آهن دو ظرفیتی فرو (Fe²⁺) آبی رنگ در محیط اسیدی پایه گذاری شده است و تغییرات رنگ و در نتیجه تغییرات جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار می گیرد [۱۸].

۱ ml از هر نمونه را با ۲/۵ ml بافر فسفات ترکیب کرده سپس ۲/۵ ml پتاسیم فری سیانید ۱٪ (۱۰ mg/ml) را اضافه کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد 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 rpm سانتریفیوژ 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 ۱٪ را اضافه کرده و جذب را با اسپکتروفتومتر در ۷۰۰ nm بررسی شد.

مشخص است هر سه ترکیب از وناادیوم شباهت معنی داری 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 معنی داری، با خواص آنتی‌اکسیدانی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین C برابری کرده است.



شکل ۲. نتایج تست DPPH. میانگین نتایج حاصل از سه بار تکرار مستقل تست DPPH برای هر نمونه با $(P \leq 0.05)$ است. در این جا اسکوریک 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٪ از DPPH را دارد. (جدول ۱).

جدول ۱. محاسبه EC_{50} برای هر یک از کمپلکس‌های V1، V2، V3 و VitC 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 V1 و V2 به ترتیب در غلظت‌های بالاتری رخ می‌دهد

Compound	$EC_{50}(\mu\text{g/ml})$
V1	۳۱۶/۸۲۸
V2	۲۵۱/۶۷۸
V3	۱۹۱/۲۰۶
VitC	۲۷/۹۳

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 سلول‌ها برای زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت محیط کشت سلول‌ها را محیط کشت حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از کمپلکس‌های وناادیوم و غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی ۵-فلوروئوراسیل (5-FU) و 5-Fluorouracil تعویض شد. در هر یک از زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت سلول‌ها را به کمک تریسین از کف جدا شد. برای تهیه هر کدام از رنگ‌ها مقدار ۱۰۰ میکروگرم از رنگ را در ۱ میلی‌لیتر PBS ترکیب کرده و ترکیبی با نسبت حجمی یک از هر دو رنگ تهیه شد. ۵۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که دارای 4×10^4 سلول است را با ۱ میکرولیتر از محلول رنگ AO/EB ترکیب شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن را روی لام با میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد. در زمان‌ها ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از سلول‌های رنگ شده توسط دوربین و میکروسکوپ فلوروسنت تصویر تهیه شد و برای به دست آوردن میزان آپوپتوز در سلول‌ها حداقل ۱۰ میدان مختلف شمارش شد.

ارزیابی قدرت مهاجم سلول‌ها (Migration): برای انجام تست Migration که برای بررسی قدرت مهاجم سلول‌ها انجامی شود ابتدا سلول‌های MKN45 با تراکم سلولی 1.05×10^5 سلول در حجم ۱ ml در پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده و بعد از رسیدن به تراکم ۸۰٪ در وسط هر یک از چاهک‌ها و در میان سلول‌ها شیار ایجاد کرده و سپس با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از کمپلکس‌های وناادیوم و ۵-فلوروئوراسیل در محیط کشت سلول‌ها را تیمار کرده و با تصویربرداری از سلول‌ها در زمان‌های مختلف میزان پر شدن شیار ارزیابی شد.

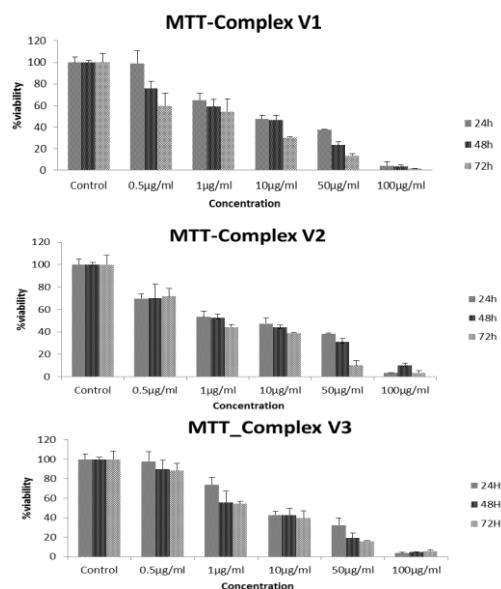
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تجزیه تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 20 و Microsoft Excel 2010 استفاده شد. به منظور بررسی تفاوت بین گروه‌ها از روش‌های زوجی و آنالیز واریانس یک طرفه (Tukay) و من‌ویتنی انجام شد با سطح معنی داری $P < 0.05$.

نتایج

نتایج حاصل از تست DPPH: به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر یک از کمپلکس‌های وناادیوم از ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از هر کمپلکس وناادیوم و ویتامین C غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و آزمایش انجام شد. همان‌طور که در (شکل ۲)

نشده اند بعد از گذشت ۷۲ ساعت سلول ها ۱۰۰٪ کفایت را پوشانده اند و کاملاً شکل دوکی کشیده را نشان می دهند. اما بعد از درمان با کمپلکس V2 سلول های کم تری در پلیت رشد کردند و سلول ها بعد از ۴۸ ساعت بیشتر به فرم چروکیده دیده می شوند که به دلیل متراکم شدن کروماتین است و کم تر به شکل دوکی دیده می شوند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت اکثر سلول ها فرم و از هم متلاشی شده هستند و غشاء مشخصی ندارند که از نشانه های سلول های آپوپتوتیک است. شبیه این اتفاق برای سلول هایی که با ComV3 درمان شدند نیز دیده می شود اما سلول هایی که با ترکیب ComV1 درمان شدند با سرعت کم تری شروع به چروکیده و جمع شدن کرده اند (شکل ۵).

شکل ۴. نتایج تست MTT. اثرات وابسته به غلظت و وابسته به زمان ترکیبات وانادیوم بر مهار رشد و مرگ سلول های MKN45 در مقایسه با



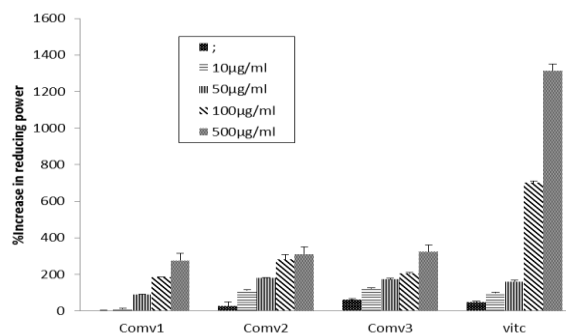
کنترل

رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید / اکریدینارنج (ET/AO):

از دیگر روش های بررسی مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) در سلول ها رنگ آمیزی سلول ها با اتیدیوم بروماید و اکریدینارنج است. اکریدین ارنج (AO) رنگ حیاتی است که به DNA و RNA سلول های مرده و زنده متصل می شود و سلول را به رنگ سبز در می آورد. رنگ اتیدیوم بروماید (EB) وارد سلول هایی که تمامیت غشا خود را از دست داده اند می شود و به سلول رنگ قرمز می دهد. (شکل ۶)

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود سلول های کنترل که با ترکیبات وانادیوم درمان نشده اند از زمان صفر تا ۷۲ ساعت بعد به میزان بسیار کمی دچار آپوپتوز شده اند (حدود ۲-۶٪ طی ۲۴ ساعت) اما در مقابل سلول های MKN45 که با داروی ۵- فولوروتوراسیل به عنوان کنترل مثبت درمان شده اند از زمان تیمار تا

نتایج تست FARP: آنتی اکسیدان های 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 می شود [۱۳، ۱۴]. برای هر کدام از سه ترکیب وانادیوم و کنترل مثبت آسکوربیک اسید (VitC) غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه با کمک تست آماری مجذور کای نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین گروه های وانادیوم و ویتامین C وجود ندارد ($p \leq 0.05$). (شکل ۳)



شکل ۳. نتایج حاصل از تست FRAP برای هر یک از کمپلکس های V1، V2 و V3. ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

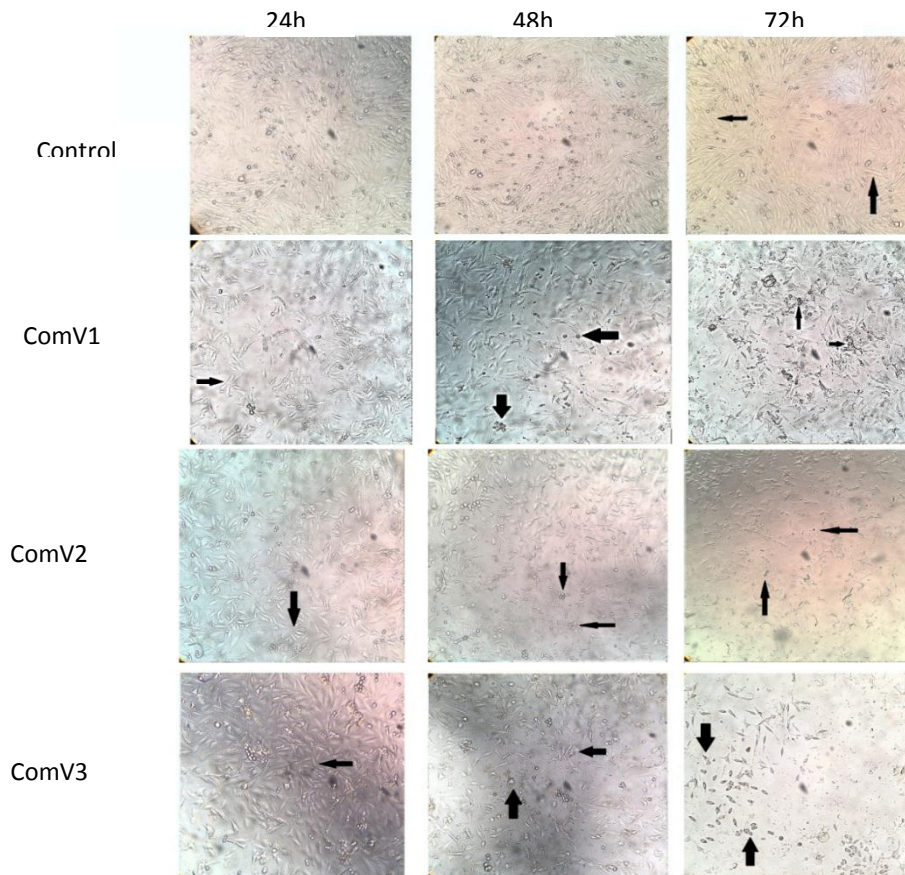
بررسی قدرت بقاء و مرگ سلولی در سلول های MKN45:

نتایج حاصل از تست MTT نشان می دهد که به نسبت کنترل که سلول های تیمار نشده هستند روند رشد سلولی کاهش پیدا کرده و در نهایت کاهش در تعداد سلول ها مشاهده می شود. در تست MTT مشخص شد که ComV2، ComV1 و ComV3 می توانند وابسته به دوز و وابسته به زمان باعث کاهش رشد و افزایش مرگ سلولی شوند. OD به دست آمده از خانه هایی که با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ از هر کدام کمپلکس های تیمار شده اند نشان دهند رشد بسیار کم سلول ها و توکسیسیتی بالای ترکیبات برای سلول های سرطان معده است. (شکل ۳) همچنین توسط تست MTT مشخص شده است که IC50 (غلظتی از ترکیبات که توانایی مهار رشد ۵۰٪ از سلول ها را دارد) برای هر کدام از ترکیبات ComV1، ComV2، و ComV3 غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد در نتیجه تست های بعدی بر اساس این دوز و زمان ۴۸ ساعت صورت گرفته است (شکل ۴).

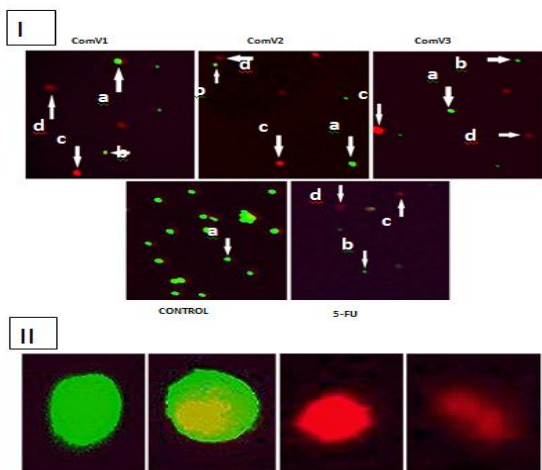
بررسی مورفولوژی سلول های MKN45: یکی از ساده ترین روش ها برای بررسی تاثیر درمان و میزان مرگ سلولی، بررسی مورفولوژی سلول ها است. همان طور که در شکل مشخص شده است سلول های MKN45 که با ترکیبات وانادیوم درمان

ComV1 درمان شده اند حدود ۳۵-۴۶٪ است، اما برای سلول‌هایی که با ComV3 درمان شده اند برابر ۲۶-۴۶٪ است. (شکل ۶ و ۷)

۷۲ ساعت بعد حدود ۶۰-۷۵٪ دچار آپوپتوز شده‌اند. همچنین سلول‌هایی که با ترکیب ComV2 درمان حدود ۴۷-۵۶٪ از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند. این مقدار برای سلول‌هایی که با



شکل ۵. بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های MKN45 قبل و بعد از درمان با ترکیبات وانادیوم. نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است ($P \leq 0.05$). در این آزمایش کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت ۵-فلوروئوراسیل است.



شکل ۶. رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج (EB/AO). تیمار با غلظت ۱ $\mu\text{g/ml}$ سلول‌های MKN45 بعد از ۴۸ ساعت. شکل (I) بزرگ‌نمایی $\times 40$. شکل (II) بزرگ‌نمایی $\times 100$. (a) نشانه سلول‌های زنده (b) سلول‌هاییکه در مراحل اولیه آپوپتوز هستند (c) نشانه سلول‌های نکروز شده (d) سلول‌هاییکه در مراحل انتهایی آپوپتوز (Late apoptosis) هستند.

بررسی قدرت تهاجم سلول (Migration): قدرت تهاجم یا قدر ترمیم زخم توانایی در سلول‌ها است که به قدر ترمیم زخم و تکثیر سلول‌ها بستگی 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 سلول‌های MKN45 بعد از کشت در میان سلول‌ها شکافی ایجاد شد و سپس برای مقایسه بهتر برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با دوز $1 \mu\text{g/ml}$ (IC50) از کمپلکس‌های وانادیوم تیمار شدند. همان‌طور که در تصاویر پائین مشخص است در مقایسه با کنترل که سلول‌های تیمار نشده MKN45 هستند سلول‌ها نتوانستند از زمان 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)

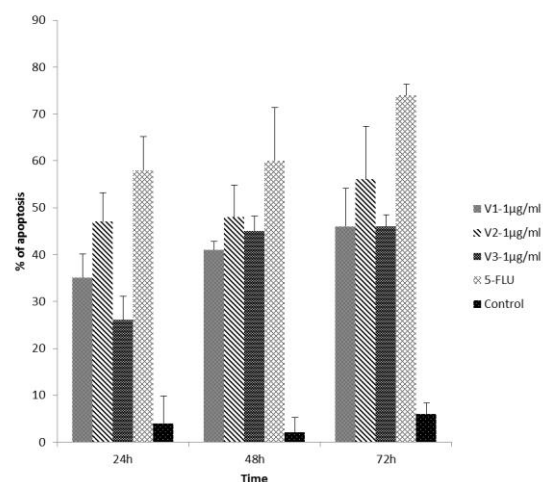
توانسته است در غلظت های مختلف درصد بیش تری از مهار DPPH را نشان دهد که می تواند به دلیل وجود استخلاف متوکسی (H3CO) در موقعیت ارتو آلهید این ترکیب باشد، زیرا متوکسی در این جایگاه خاصیت الکترون دهنده خوبی دارد. اما ComV1 که هم زمان دارای استخلاف Br در موقعیت متا به عنوان یک الکترون کشنده و استخلاف H3CO در موقعیت ارتو است، کم ترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH را نسبت سایر ترکیبات در غلظت های مختلف نشان می دهد. هم چنین محاسبه EC50 برای هر گونه نشان می دهد که ComV3 در غلظت کم تری (۱۹۱،۲۰۶ $\mu\text{g/ml}$) نسبت به دو کمپلکس دیگر توانسته است ۵۰٪ از رادیکال های آزاد را مهار کند.

بررسی نتایج آزمایش FRAP نیز نشان می دهد که هر سه کمپلکس و انادایوم توانایی احیای آهن سه ظرفیتی را در مقایسه با گروه کنترل ویتامین C دارند. ComV3 در غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیش ترین میزان احیاکنندگی را در مقایسه با دو کمپلکس دیگر حاوی انادایوم دارد. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ComV2 که تنها دارای استخلاف Br در موقعیت متا است توانسته است بیش ترین میزان احیای FeCl_3 را داشته باشد. اما ComV1 در تمام غلظت ها کم ترین میزان احیای آهن را در مقایسه با دو کمپلکس دیگر نشان داده است.

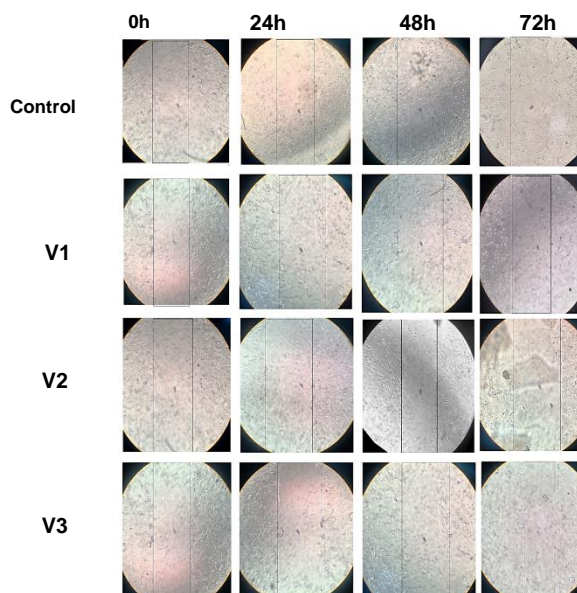
بررسی متون گذشته نشان داده اند که ترکیبات دارای انادایوم می توانند با تغییر سطح اکسیداسیون و تاثیر بر عملکرد آنزیم ها و پروتئین های مختلف به خصوص از طریق فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین تیروزین فسفاتاز (PTP) بر مسیرهای آپوپتوز رشد و تکثیر، التهاب و سیستم ردوکس سلولی تاثیر داشته باشند و ممکن است از این طریق بتوانند در درمان بیماری های مزمن مانند دیابت و سرطان نقش داشته باشند [۱۹-۲۳].

در سال ۲۰۱۴ Shengyi lui و همکارانش بر روی اثرات بیولوژیک آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی کمپلکس های جدید و انادایوم تحقیق کردند. نتایج حاصل از آزمایش DPPH نشان می دهد که کمپلکس و انادایوم توانسته است توان آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به آلزینات پلی سچوراد (APS) و آلزینات الیگوسچوراد (AOS) داشته باشد. هم چنین کمپلکس های و انادایوم توانسته اند قدرت بقاء رده سلولی هیپاتومای انسانی را کاهش داده و از طریق مهار پروتئین تیروزین فسفاتاز-B1 باعث ایجاد آپوپتوز در سلول ها شوند [۲۳].

مطالعه ما همسو با این مطالعه نشان داد که ترکیبات سنتزی حاوی و انادایوم دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالایی هستند و هم چنین هر سه ترکیب سنتزی و انادایوم توانستند قدرت بقای سلول های سرطانی MKN45 را کاهش دهند.



شکل ۷. بررسی میزان آپوپتوز در سلول های MKN45 قبل و بعد از درمان با ترکیبات و انادایوم. نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است. ($P \leq 0.05$). در این آزمایش کنترل منفی سلول های تیمار نشده و کنترل مثبت ۵-فلوروئوراسیل است.



شکل ۸. تیمار سلول های MKN45 با دوز $1 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس های V1، V2 و V3 و تصویر برداری از سلول ها در لحظه ایجاد شکاف (لحظه صفر) بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت. همانطور که در تصاویر مشخص است سلول های کنترل با گذشت ۷۲ ساعت توانستند کاملا شکاف ایجاد شده را ترمیم کنند، اما ترمیم برای سلول ها درمان شده با ترکیبات و انادایوم رخ نداده است. تمام عکس ها با بزرگنمایی X40 گرفته شده است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از انجام تست آنتی اکسیدانی DPPH در این پژوهش نشان می دهد که هر سه کمپلکس و انادایوم توان آنتی اکسیدانی نسبتاً خوبی را در مقایسه با کنترل مثبت ویتامین C نشان داده اند و اختلاف معنی داری بین گروه های تیمار شده با ترکیبات سنتزی و انادایوم و کنترل دیده نشده است. با توجه به این که هر سه کمپلکس دارای ساختار پایه یکسانی هستند بررسی داده های حاصل از تست DPPH نشان می دهد که ComV3

بعد از ایجاد شکاف در میان سلول‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های درمان نشده با گذشت زمان به طور کامل توانسته‌اند فضای خالی را پر کنند اما سلول‌هایی که با کمپلکس‌های سنتزی و انادیوم 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 سلول‌های MKN45 با اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج نشان می‌دهد که بعد از گذشت ۴۸ ساعت از درمان سلول‌ها با کمپلکس‌های و انادیوم 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 کمپلکس V2 توانسته است تعداد بیش‌تری از سلول‌های MKN45 را در مقایسه با سلول‌هایی که با ۵-فلوروئوراسیل تیمار شده‌اند و سلول‌هایی که با کمپلکس‌های V1 و V3 تیمار شده‌اند، دچار آپوپتوز کند.

مطالعه مشابهی توسط María del Carmen García-Rodríguez در سال ۲۰۱۶ بر روی اثرات ضدسرطانی و انادیوم در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین C و الف-توکوفرول بر روی خون محیطی موش‌ها انجام شد. آن‌ها موش‌ها را برای 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 آسکوربیک اسید، گروه دیگر با ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آلفا توکوفرول، یک گروه با ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از و انادیوم و دو گروه دیگر به صورت ترکیبی و انادیوم به همراه آسکوربیک اسید و و انادیوم به همراه آلفا توکوفرول 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 و انادیوم به تنهایی و همراه با آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند موجب افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های خون محیطی شود اما نتایج آزمایش رنگ‌آمیزی (ET/AO) نشان می‌دهد که افزایش میزان نکروز در سلول‌ها تنها بعد از تیمار با و انادیوم به تنهایی دیده می‌شود [۱۹].

این مطالعه نیز با مطالعه ما همسو بود اما برای تیمار سلول‌های خونی از غلظت‌هایی در واحد غلظتی Mg/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 سلول‌های سرطانی 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

بررسی میزان سمیت و کشندگی کمپلکس‌های سنتزی و انادیوم و به دست آوردن IC50 ترکیبات از طریق آزمون MTT برای غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵۰، ۱۰۰ 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 و انادیوم وابسته به زمان و وابسته به غلظت می‌توانند موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌های MKN45 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 ۴۸ ساعت و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند بیان‌کننده IC50 برای سلول‌های MKN45 باشد این در حالی است که دو کمپلکس V1 و V2 در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به IC50 خود برای این سلول‌ها می‌رسند. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از چندین بار تکرار آزمایش MTT 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 سلول‌های دیگر اثر داده شده است را مقایسه کرد که بررسی ما نشان داد که میزان IC50 به دست 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/ml ارائه داده است.

به منظور تایید نتایج حاصل از MTT و وقوع آپوپتوز در سلول‌های MKN45 بعد از تیمار با کمپلکس‌های و انادیوم به بررسی مورفولوژی سلول‌های MKN45، بررسی قدرت ترمیم زخم سلول‌ها و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج پرداخته شد.

بسیاری از سلول‌های MKN45 بعد از درمان با کمپلکس‌های سنتزی و انادیوم 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 سلول‌های MKN45 که با کمپلکس V2 درمان شده‌اند سریع‌تر از درمان با سایر کمپلکس‌ها اتفاق می‌افتد. هم‌چنین بررسی قدرت تهاجم سلول‌های MKN45

[10] Faneca H, Figueiredo VA, Tomaz I, Goncalves G, Aveçilla 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 Chem* 2003; 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. Acta* 2013; 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 Diet* 1986; 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 Polym* 2015; 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] Yarigaravesh 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, Patnrogic 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.

شناخته شده در جهت تقویت اثر دارو و کاهش عوارض جانبی آن اقدام به تغییر گروه های عاملی و لیگاندهای متصل کرده و ترکیبات سنتزی جدید ارائه می دهند [۲۵]. از جمله ترکیباتی که در شیمی درمانی بیماران سرطانی تاثیر گذار است می توان به داروی سیس پلاتین اشاره کرد که با اختلال در همانندسازی DNA از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کند اما به دلیل این که سیس پلاتین دارویی هزینه بر است و علاوه بر آن استفاده از آن می تواند به سلول های بافت سالم فرد نیز آسیب وارد کند در نتیجه مصرف آن با محدودیت های بسیاری همراه است و تحقیقات برای دست یابی به ترکیباتی از مواد معدنی و آلی که بتوانند به طرز موثری و با کم ترین سمیت برای سایر سلول ها در درمان سرطان مفید باشند ادامه دارد [۲۶، ۲۴] و پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی به بررسی تاثیر ترکیبات سنتزی در فرایندهای مولکولی تاثیر گذار در آپوپتوزیس و بررسی تغییرات بیان ژن های مربوطه پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان به شماره طرح A-10-315-7 انجام 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 Endosc* 2013; 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 Sci* 1995; 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.

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

Maedeh Dejamfekar (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 ($IC_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$). 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, Apoptosis, Vanadium, Synthetic Compounds