

Toxicity effect of synthesized platinum Schiff bases on SKBR3 breast cancer cell line

Parisa Baz Sefidpar¹, Ebrahim Eftekhari², Amin Reza Nikpoor², Samaneh Zolghadri¹, Mohammad Zareian Jahromi^{1*}

¹Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

Abstract

Introduction: Breast cancer is a prevalent disease that has not been entirely treated by chemotherapy. This study attempted to investigate the effect of the cytotoxicity of Schiff bases derived from platinum (II) on the breast cancer cell line (SKBR3) and the expression of genes involving molecular pathways.

Materials and Methods: In this study, at first, the cytotoxicity of carboplatin (as the standard drug) and Schiff base derived from platinum (II) (12.5, 52, and 50 μ M) on the SKBR3 cell line was investigated using MTT assay, and the half maximal inhibitory concentration (IC50) was determined. After cell treatment, RNA was extracted, and cDNA was synthesized. Then gene expression of various cellular pathways of apoptosis (BCL2 and BAX) and autophagy (ATG5, BECN1, TOP1, LC3, and HIF1A) was evaluated using the Real-time PCR method.

Results: Cell treatment with platinum (II) Schiff bases complexes in various concentrations showed that complex A (IC50=34.76 $\pm$ 2.16 μ M) had the most significant toxicity compared to other studied compounds. The synthesized complexes may affect the cytotoxicity of SKBR3 through suppression of HIF1A and TOP1 genes. Statistical analysis of samples was conducted using SPSS software program, two-way ANOVA analysis, and Kruskal-Wallis tests at the significance level of 0.05 and 0.001.

Conclusion: In this research, platinum-based Schiff bases showed a significant cytotoxic effect against the SKBR3 cell line. More information in this field can pave the way for discovering anticancer platinum drugs with more favorable properties.

Keywords

Cytotoxicity, Apoptosis, Autophagy, Antitumor, Platinum complexes

Received: 2022/07/17

Accepted: 2023/03/01

*Corresponding Author:
mzarein88@gmail.com

Ethics Approval:
IR.IAU.KAU.REC.1401.042



Introduction

Breast cancer is considered as the most common cancer and one of the main causes of death among women worldwide (1). Considering the wide spread of breast cancer, the identification and synthesis of anticancer compounds and complexes are of particular importance. Schiff bases are obtained from condensation reactions of aromatic/aliphatic aldehydes and amines and form stable complexes with various metal ions. Metal complexes in drug therapy have therapeutic effects in medicine. Platinum complexes represent a distinct class of antineoplastic compounds (2). This paper is intended to study the anticancer effects of some new platinum compounds on breast cancer cells. According to the mechanisms of apoptotic and autophagic effects of platinum derivatives such as cisplatin and oxaliplatin, several complexes involved in these signaling pathways have been investigated.

Materials & Methods

In this study, the SKBR3 breast cancer cell line was cultured in RPMI 1640 medium. Schiff bases containing PT245, PT246, and PT247

were synthesized to treat the cells named complexes A, B, and C, respectively. The drug carboplatin was also used as a control to compare the effects of the complexes. The sensitivity and cytotoxic effects of the synthetic complexes on SKBR3 cells were evaluated with the MTT assay. A Real-time PCR method was used to measure gene expression. 300,000 SKBR3 cells were treated with synthetic complexes at optimal ranges of 12.5, 25, and 50 μM obtained from MTT assay results. After 72 hours, total RNA was extracted, and the expression of TOP1, HIF1A, BAX, BCL2, BECN1, ATG5, and LC3 genes was evaluated. The significance of the results was checked at ($p < 0.05$) and ($p < 0.001$) levels using the statistical analysis of samples.

Results

By performing the MTT test, the sensitivity of the SKBR3 cell line to compounds A, B, and C was determined in comparison to carboplatin. IC₅₀ values, 72 hours after exposure to Carboplatin, Complex A, Complex B, and Complex C were evaluated and reported in Table (1).

Table 1: Checking the IC₅₀ values of complexes A, B, and C compared to carboplatin after 72 hours of treatment on the SKBR3 cell line by MTT ($p < 0.05$)

cell line	IC ₅₀ value, μM			
	Carboplatin	Complex-A	Complex-B	Complex-C
SKBR3	44.5506 $\pm$ 4.28	34.76 $\pm$ 2.16*	42.731 $\pm$ 1.17	47.4616 $\pm$ 2.98

Table 1 shows that the IC₅₀ of complex A (34.76 μM) compared to carboplatin (44.55 μM) is significantly reduced ($P=0.0432$). This reduction in B and C complexes is not statistically significant ($p < 0.05$). The results of Real-time PCR show that the TOP1 gene is significantly reduced in the sets of the investigated complexes A, B, and C. The expression of this gene after treatment with 50 μM complex A at the level of $p < 0.001$ and with the value of fold change (FC) = 0.067 is significantly reduced compared to the control. Moreover, the expression of HIF1A after

treatment with Complex A set and 25 and 50 μM Complex C gene was associated with a significant decrease ($p < 0.001$). Treatment with 50 μM complexes A and C can be calculated by applying FC 0.091 and 0.096 to the expression of this gene, respectively. In the analysis of the expression of genes associated with apoptosis, the results showed that after treating the cells with A and C complexes at 50 μM concentration, respectively, the expression of the BCL2 gene decreased with FC values of 0.083 and 0.228 compared to control ($p < 0.001$), but no changes in BAX gene

expression were observed at any of the tested concentrations of the complexes. Examination of the expression of genes associated with the autophagy pathway after treatment with

different concentrations of the complexes under study showed no significant difference compared to the expression of these genes in cells without drug treatment (Figure 1).

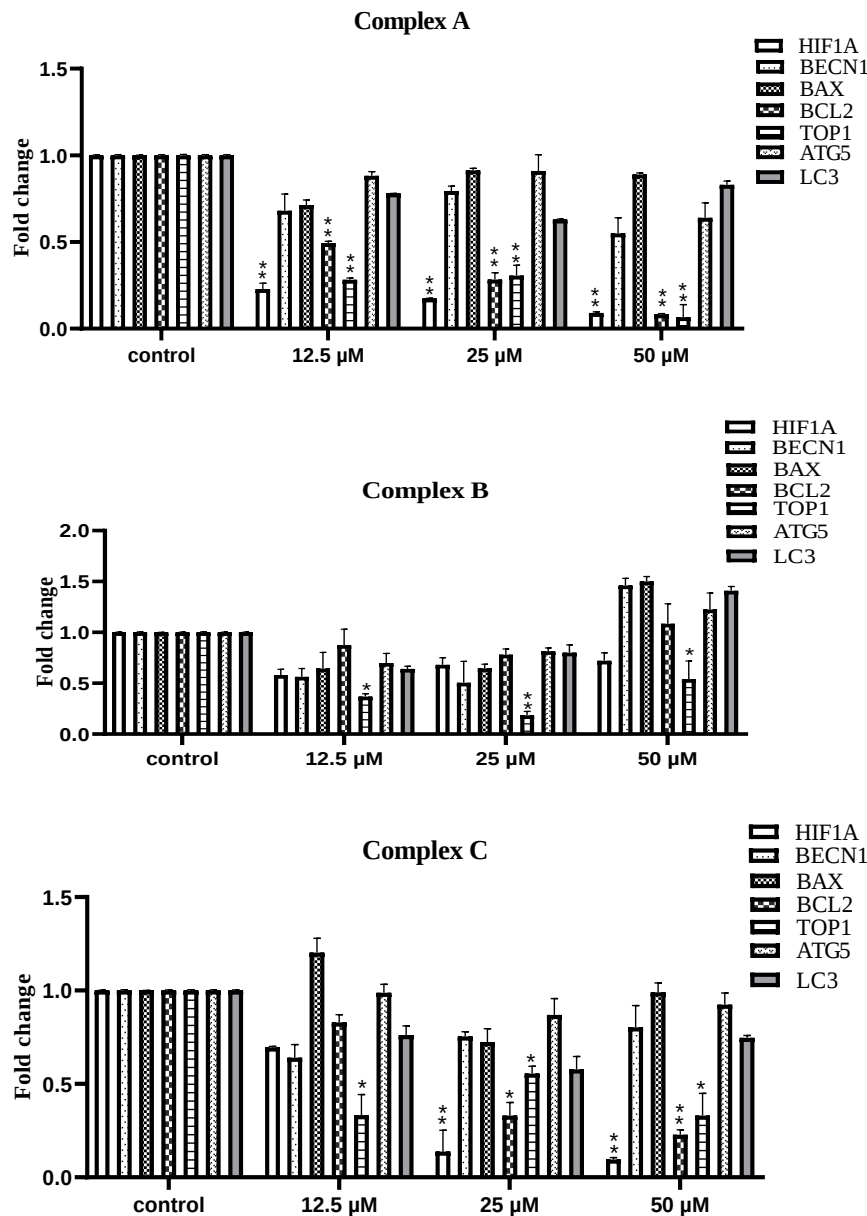


Figure 1: The effect of treatment of the SKBR3 cell line for 72 hours with 12.5, 25, and 50 μM of complexes A, B, and C on the expression of HIF1A, ATG5, LC3, BECN1, BAX, BCL2, and TOP1 genes. All results are considered as mean ± SD. p<0.05)* and ** (p <0.001)

Discussion

In this study, using the MTT colorimetric method, Complex A was shown to have a dose-dependent lethal effect on breast cancer cells. We also observed that treatment with different platinum-derived complexes

significantly decreased TOP1 gene expression at all concentrations. The expression of the HIF1A gene was also statistically significantly decreased in all concentrations of complex A and 25 and 50 μM concentrations of complex C. In a research study on the relative

contribution of HIF1A gene expression and drug penetration to oxaliplatin resistance, Roberts et al. (2009) stated that drug penetration, the level of DNA damage, and HIF1A-dependent processes all contributed to the resistance of hypoxic cells to oxaliplatin (3). In the present study, HIF1A gene expression showed a significant decrease in high concentrations of all three complexes. Another signaling pathway investigated in this study was the apoptotic pathway measured by the expression of the BAX and BCL2 genes. The results showed that the change in BAX gene expression was not statistically significant, but the decrease in BCL2 gene expression in complexes A and C was significant. Zhang et al. (2019) stated that piperidone/cyclohexanone-derived Schiff bases can regularly increase cell apoptosis in A549, SGC7901, HePG2, HeLa, K562, THP-1, and non-malignant LO2 cell lines by increasing BAX expression and decreasing BCL2 expression (4). Studies have shown that autophagy supports tumor cells in response to cancer treatments by making them more resistant to therapy. Therefore, in this study, we examined the expression of three genes involved in the autophagy pathway, including BECN1, LC3, and ATG5. Expression of all the above genes related to the autophagy pathway was non-significant in response to platinum derivative treatment. The results of the study indicate that synthesized complexes may exert anticancer effects through other pathways.

Conclusion

Treatment of the cells with various concentrations of platinum(II)-derived Schiff base complexes showed that complex A caused the highest lethality compared to the other compounds studied. Our study showed that the synthesized complex could exert lethal

effects on the SKBR3 cell line by inhibiting TOP1 and HIF1A gene expression. Moreover, the decreased expression of *Bcl2* upon treatment of cells with the investigated complexes may indicate their role in apoptosis induction. However, further studies are needed to fully understand the mechanism of action of platinum-based drugs.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to the work of Dr. Mehbooba Eslami Moghadam for the synthesis of the used compounds.

Conflict of interest

There is no conflict of interest in the present study.

References

1. Mahdavi Neda, Pakzad Reza, Ghoncheh Mahshid, Pakzad Iraj, Moudi Asieh, Salehiniya Hamid. Spatial Analysis of Breast Cancer Incidence in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17(S3):59-64
2. Brabec V, Kasparkova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug resistance updates*. 2002;5(3-4):147-61
3. Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, et al. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *British journal of cancer*. 2009;101(8):1290-7.
4. Zhang L, Chen Q, Hou G, Zhao W, Hou Y. Hydroxyl-substituted double Schiff-base condensed 4-piperidone/cyclohexanones as potential anticancer agents with biological evaluation. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2019;34(1):264-71.

بررسی اثر سمیت شیف بازهای سنتز شده مشتق از پلاتین (II) بر روی

رده سلولی سرطان پستان SKBR3

پریسا باز سفیدپر^۱، ابراهیم افتخار^۲، امین رضا نیک پور^۲، سمانه ذوالقدری^۱، محمد زارعیان جهرمی^{۱*}

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، فارس، ایران

^۲ مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، مرکز سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان، بیماری شایعی است که هنوز داروهای شیمی درمانی نتوانسته است آن را به طور کامل درمان کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت سلولی شیف بازهای مشتق از پلاتین (II) بر رده سلولی سرطان پستان (SKBR3) و آنالیز بیان ژن های دخیل در مسیرهای مولکولی است.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا سمیت سلولی داروی کربوپلاتین به عنوان داروی استاندارد و شیف بازهای مشتق از پلاتین (II) بر روی رده سلولی SKBR3 با استفاده از روش MTT در غلظت های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار بررسی شد و غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50}) آن تعیین شد. پس از تیمار سلول ها با غلظت های فوق، RNA سلول استخراج شده و cDNA سنتز شد و میزان بیان ژن های مسیرهای مختلف سلولی از جمله آپوپتوز (BAX و BCL2)، اتوافازی (ATG5، BCN1، LC3 و TOP1 و HIF1A) با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته ها: تیمار سلول ها با کمپلکس های شیف بازهای مشتق از پلاتین (II) در غلظت های مختلف نشان داد کمپلکس A ($IC_{50}=34.76\pm 2.16\mu M$) بیشترین میزان کشندگی را نسبت به دیگر داروهای مورد بررسی داشته است. هم چنین مشخص شد که کمپلکس های سنتز شده از طریق مهار بیان ژن های TOP1 و HIF1A می تواند اثر کشندگی بر روی رده سلولی SKBR3 اعمال کنند. آنالیز آماری نمونه ها به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از One way ANOVA و Kruskal-wallis test در سطح معناداری ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ صورت گرفت.

نتیجه گیری: شیف بازهای مشتق از پلاتین (II) مورد مطالعه در این تحقیق، اثر کشندگی قابل توجهی در برابر رده سلولی SKBR3 نشان دادند. مطالعات بیشتر در این زمینه می تواند راهگشای اکتشاف داروهای پلاتینی ضدسرطان با خواص مطلوب تری باشد.

واژه های کلیدی: سمیت سلولی، آپاپتوز، اتوافازی، ترکیبات پلاتینی

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

* نویسنده مسئول:

mzarein88@gmail.com

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت عمومی در جهان است. آمار مربوط به بروز و مرگ‌ومیر نشان می‌دهد که این بیماری در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته اقتصادی در حال رشد است (۱). بالاترین نرخ مرگ و میر در منطقه مدیترانه شرقی (EMRO) و پس از آن منطقه آفریقا (AFRO) گزارش شده است (۲).

سرطان پستان بیشترین سرطان تشخیص داده شده و یکی از علل اصلی مرگ و میر زنان در سراسر جهان است (۳). با توجه به شیوع گسترده سرطان پستان، شناسایی و سنتز ترکیبات و کمپلکس‌های ضد سرطان دارای اهمیت ویژه‌ای است. یکی از اشکالات داروهای ضد سرطان، این است که این داروها بر سایر بافت‌های طبیعی بدن نیز اثر می‌گذارند. لذا محققین همیشه در پی یافتن داروهایی هستند که به‌صورت اختصاصی‌تر بر سلول‌های سرطانی اثر کنند و عوارض کمتری در سلول‌های نرمال ایجاد نمایند. در تحقیقات داروهای جدید سنتز شده ابتدا بر سلول‌ها در شرایط برون تنی (*in vitro*) و به صورت آزمایشگاهی تأثیر داده می‌شوند تا پس از دستیابی به نتیجه به صورت درون تنی (*in vivo*) نیز مورد بررسی قرار گیرند (۴-۶).

شیف بازها از واکنش چگالش آلدئیدهای معطر/آلیفاتیک و آمین‌ها به‌دست می‌آیند و کمپلکس‌های پایدار با یون‌های مختلف فلز گذار را تشکیل می‌دهند. کمپلکس‌های فلزی در درمان‌های دارویی اثر گسترده‌ای در علم پزشکی داشته‌اند (۷-۹). داروهای پلاتین یک طبقه منحصر به فرد و مهم از عوامل ضد توموری را نشان می‌دهند. کشف سیس پلاتین در دهه‌ی ۱۹۷۰ موجب تغییر در شیمی درمانی شده‌است (۱۰). طی این روند بسیاری از کمپلکس‌های نسل دوم آنزیم‌های سیس پلاتین سنتز شده‌اند که برخی از آن‌ها مانند اگزالی پلاتین خواص درمان مشابهی با سیس پلاتین دارند. مکانیسم عمل این داروها به تشکیل محصول اضافی پایدار با DNA بستگی دارد که این کار مانع رونویسی و تکثیر سلولی شده و در نهایت منجر به القای آپوپتوز می‌شود (۱۱).

مطالعات نشان می‌دهد یکی از مکانیسم‌هایی که داروی کربوپلاتین رشد سلول‌های سرطان پستان را مهار می‌کند، القای آپوپتوز است. آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلول است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده و مضر می‌شود و برای رشد طبیعی، حذف سلول‌های تخریب شده و هموستازی بافتی ضروری است (۱۲).

آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش گر نقش دارد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز منجر به بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خودایمنی می‌شود (۱۳).

اتوفازی مکانیسم دیگری است که توسط درمان سیس پلاتین و اگزالی پلاتین ایجاد می‌شود و مطالعات نشان داده که این مکانیسم بقای سلول را در شرایط استرس زا افزایش می‌دهد (۱۴). اتوفازی یک مسیر داخل سلولی عمده برای تخریب و بازیافت پروتئین‌هایی با عمر طولانی و اندامک‌های آسیب دیده است که از طریق مسیرهای مختلف شامل ماکرواتوفازی، میکرواتوفازی و اتوفازی به‌واسطه‌ی چاپرون‌ها اتفاق می‌افتد (۱۵، ۱۶). در ماکرواتوفازی (که به‌عنوان اتوفازی شناخته می‌شود) بخشی از سیتوپلاسم سلول داخل یک واکوئل تخصصی به نام اتوفازوزوم فرو می‌رود که در نهایت با وزیکول‌های لیوزوزوم برای تخریب مواد مصادره شده ادغام می‌شود. اتوفازی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژی مثل رشد سلول، پیری، مرگ سلولی، پاسخ استرس و پاسخ ایمنی هم‌چنین در سرطان درگیر است (۱۵). تقریباً ۳۰ ژن فرآیند اتوفازی را تنظیم می‌کنند که همه‌ی آن‌ها در مخمر کشف شده‌اند و ۱۶ همولوگ آن‌ها در انسان شناسایی شده‌اند (۱۷). در این میان ژن‌های BCN1 و LC3 نقش محوری در اتوفازی دارند. TOP1 از ژن‌های مورد نیاز برای ترمیم DNA است که همه بازدارنده‌های TOP1 با اتصال به کمپلکس TOP1-DNA، منجر به حفظ شکست‌های تک زنجیره در DNA، در نتیجه منجر به تشکیل شکست‌های دو رشته DNA می‌شوند که باعث

پلاتینی از جمله سیس پلاتین و اگزالی پلاتین چند ژن مرتبط با این مسیرها مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

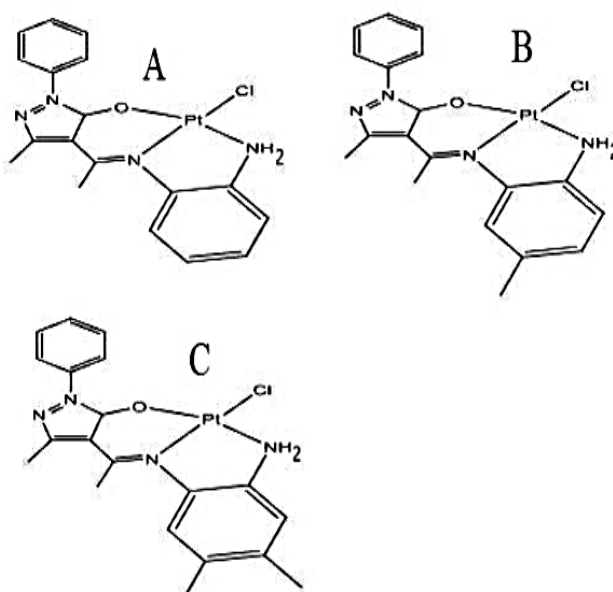
این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس انجام شد. در این مطالعه از رده سلولی SKBR3 برای ارزیابی خواص ضد سرطانی ترکیبات شیف باز پلاتین به شرح زیر استفاده شد.

کشت سلول: رده سلولی سرطان سینه SKBR3 در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۲ میلی مولار از L گلوتامین، ۱۰٪ FBS، پنی سیلین به میزان ۱۰۰ واحد/ میلی لیتر و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵٪ CO₂ کشت داده شد.

تیمار سلول‌ها با ترکیبات پلاتین: برای تیمار سلول‌ها از شیف بازهای سنتز شده (تهیه شده از پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران) که روش سنتز آن قبلاً گزارش شده است (۲۳)، استفاده شد. همچنین از داروی کربوپلاتین به عنوان شاهد جهت مقایسه اثر کمپلکس‌ها استفاده شد. شیف بازهای سنتز شده شامل PT245، PT246 و PT247 بودند که در این مطالعه، به ترتیب تحت عنوان کمپلکس A، B و C نامگذاری شدند (شکل ۱). از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. تا زمان استفاده محلول‌ها در درمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

مرگ سلول می‌شود (۱۸). یکی از فاکتورهای رونویسی حساس به هایپوکسی و دخیل در بیان بسیاری از ژن‌های مربوط به پدیده‌هایی همچون آنژیوژنز، متابولیسم گلوکز و تکثیر سلولی، Hypoxia-inducible factor (HIF1A) می‌باشد (۱۹). علاوه بر هایپوکسی، NO، ROS، TNF، IL1B و ویروس‌ها نیز می‌توانند باعث القا در فعالیت HIF1A شود (۲۰). سلول‌های آپوپتوتیک هم‌چنین می‌توانند بیان HIF1A را به روشی وابسته به NFAT تنظیم کنند. ترکیبی از مهار HIF1A و درمان ضد آنژیوژنیک ممکن است یک استراتژی جدید برای بیماران سرطان پستان باشد (۲۱).

علیرغم کاربردهای گسترده داروهای کلاسیک پلاتینی برای درمان سرطان از جمله سرطان پستان، حلالیت ضعیف، سمیت شدید و مقاومت دارویی درونی و اکتسابی کاربرد بالینی آن‌ها را محدود کرده است. به همین دلیل، تلاش محققان در جهت سنتز کمپلکس‌های جدید مشتق از پلاتین با خواص مطلوب و پتانسیل مهار سلول‌های سرطانی می‌تواند رویکرد بسیار مناسبی جهت غلبه بر مقاومت این سلول‌ها در مقابل داروهای روتین شیمی درمانی مانند سیس پلاتین، کربوپلاتین و اگزالی پلاتین باشد (۲۲). در این تحقیق سعی شده است اثرات ضد سرطانی چند ترکیب جدید مشتق از پلاتین بر روی سلول‌های سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گیرد. هم‌چنین با توجه به مکانیسم اثر آپاپتوزی و اتوفازی مشتقات



شکل ۱: ساختار ترکیبات سنتز شده مشتقات پلاتینی

A: 4-[(1E)-N-(2-aminophenyl)ethanimidoyl]-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol platinum(II) chloride: [Pt(SHB247)Cl]

B: 4-(1E)-N—(2-amino-5-methylphenyl)ethanimidoyl]-3-methyl-1-phenyl-1H pyrazol-5-ol platinum (II) chloride: [Pt(SHB245)Cl]

C: 4-[(1E)-N-(2-amino-4,5-dimethylphenyl)ethanimidoyl]-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol platinum (II) chloride: [Pt(SHB246)Cl]

تیمار شدند (با توجه به این که IC_{50} بیشتر ترکیبات پلاتینی در محدوده زیر ۱۰۰ میکرومولار است، این محدوده برای سنجش سمیت ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت). به چاهک گروه کنترل به جای دارو محیط فاقد دارو اضافه شد. در مرحله بعد مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت نهایی ۰/۵ mg/ml) به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در مرحله آخر محلول رویی دور ریخته شد و کریستال‌های تشکیل شده در ۳۰۰ میکرولیتر از DMSO حل شد و جذب نوری هر چاهک با استفاده از Trinitiy Biotech ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

برای محاسبه درصد زنده ماندن سلول‌ها، جذب سلول‌های تیمار شده با دارو بر جذب سلول‌های گروه کنترل (بدون دارو) تقسیم شده و در عدد ۱۰۰ ضرب شد. برای محاسبه IC_{50} (غلظتی از دارو که باعث ۵۰ درصد مرگ و میر می‌شود)، از نرم‌افزار Graphpad prism (version

سنجش سمیت سلولی و MTT Assay: برای ارزیابی حساسیت و اثر سیتوتوکسیک کمپلکس‌های سنتز شده بر روی سلول SKBR3 از تست MTT (3-(4,5)-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide استفاده شد. اصول تست MTT بدین صورت است که آنزیم دهیدروژنازهای میتوکندری در سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیسمی قادرند نمک زرد تترازولیوم را شکسته و کریستال‌های فورمازان ارغوانی را به وجود آورند که شدت رنگ این کریستال پس از حل شدن در دی متیل سولفوکسید (DMSO) با تعداد سلول‌های زنده متناسب است.

برای انجام تست MTT، تعداد ۵۰۰۰ عدد از سلول‌های SKBR3 با لام ۹۶ پلک شمارش شد و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای در حجم ۲۰۰ میکرولیتر کشت داده شد و برای ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت کمپلکس‌های سنتز شده و کربوپلاتین (۱۰۰-۱/۵۶ میکرومولار) به مدت ۷۲ ساعت

کیفیت RNA استخراج شده نیز با استفاده از ژل آگارز سنجیده شد. برای ساخت cDNA از کیت تاکارا (TaKaRa, Tokyo, Japan) استفاده شد. سپس برای ارزیابی بیان ژن‌های TOP1، HIF1A، BAX، BCL2، BECN1 و ATG5 از مسترمیکس سایبرگرین RealQ Plus 2x Master Mix (Green –) (Ampliqon, Denmark) و Real-Time PCR (Qiagen, Germany) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. میزان بیان ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

8.00; GraphPad Software, San Diego, CA, USA استفاده شد.

استخراج RNA جهت سنجش بیان ژن‌ها به روش Real time PCR: ۳۰۰۰۰۰ عدد سلول SKBR3 در ۲ میلی لیتر محیط کشت در پلیت‌های شش خانه در شرایط استاندارد کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، سلول‌ها در بازه غلظتی ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از کمپلکس‌های سنتز شده تیمار شدند. بعد از ۷۲ ساعت، RNA تام با استفاده از کیت RiboEx LSTM (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) استخراج شد و غلظت آن به وسیله اسپکتروفتومتری تعیین و از نسبت A260/A280 برای ارزیابی ناخالصی استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرها جهت انجام واکنش Real-time PCR

Genes	Forward primer	Reverse primer
BAX	5'-GCCTCCTCTCCTACTTTG-3'	5'-CTCAGCCCATCTTCTTCC-3'
BCL2	5'-CTGCACCTGACGCCCTTACC-3'	5'-CACATGACCCCACTCAAGA-3'
TOP1	5'-CAACTGTAGCAAAGATGCC-3'	5'-GTAACCTTGTTATCATGCCG-3'
HIF1A	5'-AGGAAATGAGAGAAATGCTTA-3'	5'-GGTTGGTTACTGTTGGTAT-3'
BECN1	5'-TGGACACGAGTTTCAAGAT-3'	5'-CTGGCGAGGAGTTTCAATA-3'
ATG5	5'-ATGACAGATGACAAAGATG-3'	5'-CTCATAACCTTCTGAAAGTG-3'
LC3	5'-TAAGGAGGTACAGCAGAT-3'	5'-GGATGATCTTGACCAACT-3'
GAPDH	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTAT-3'	5'-AGTCCTTCCACGATACCAA-3'

نتایج حاصل از بررسی سمیت داروها بر رده سلولی SKBR3: حساسیت رده سلولی SKBR3 نسبت به ترکیبات B، A و C در مقایسه با کربوپلاتین تعیین شد. مقادیر IC_{50} ، ۷۲ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض Carboplatin، Complex A، Complex B، Complex C در جدول (۲) گزارش شده است.

آنالیز آماری: آنالیز آماری نمونه‌ها به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از One way ANOVA و Kruskal-wallis test میزان معنی دار بودن نتایج در سطح (p < 0.05) و (p < 0.001) بررسی شد.

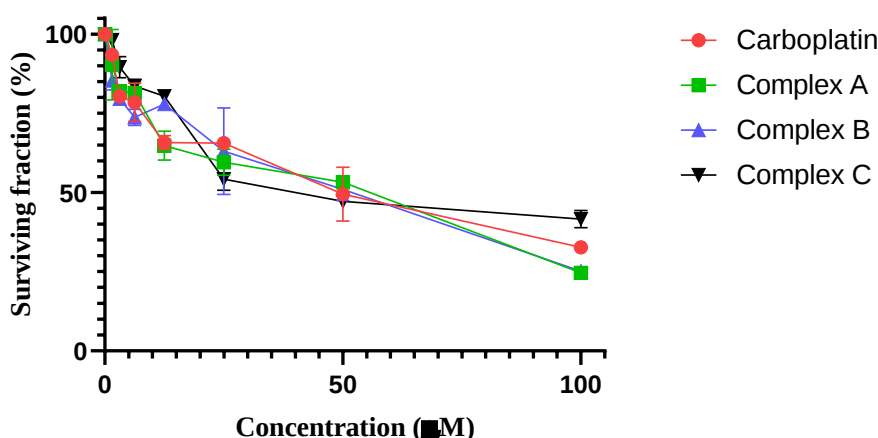
یافته‌ها

جدول ۲: بررسی مقادیر IC_{50} کمپلکس‌های A، B و C نسبت به کربوپلاتین پس از تیمار ۷۲ ساعت بر رده سلولی SKBR3 به روش MTT (p < 0.05) (*)

IC ₅₀ value, μ M				
cell line	Carboplatin	Complex-A	Complex-B	Complex-C
SKBR3	44.5506±4.28	34.76±2.16*	42.731±1.17	47.4616±2.98

درصد زنده ماندن سلول‌های SKBR3 پس از تیمار ۷۲ ساعته با کمپلکس‌های A، B و C و داروی کربوپلاتین در شکل (۲) نشان داده شده است. نمودار مربوط به کمپلکس‌های A و B و کربوپلاتین شیب کاهشی داشته‌اند اما کمپلکس C در بازه غلظتی بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از روند ثابتی برخوردار بوده است.

همانطور که در جدول قابل مشاهده است، میزان IC_{50} کمپلکس A (۳۴/۷۶ میکرومولار) نسبت به کربوپلاتین (۴۴/۵۵ میکرومولار) کاهش معنی داری داشته است ($P=0.0432$). در حالی که این کاهش در کمپلکس B از نظر آماری معنی دار نبوده است. همچنین نتایج نشان داده است، تغییرات IC_{50} کمپکس C در مقایسه با کربوپلاتین معنی دار نبوده است ($p < 0.05$).

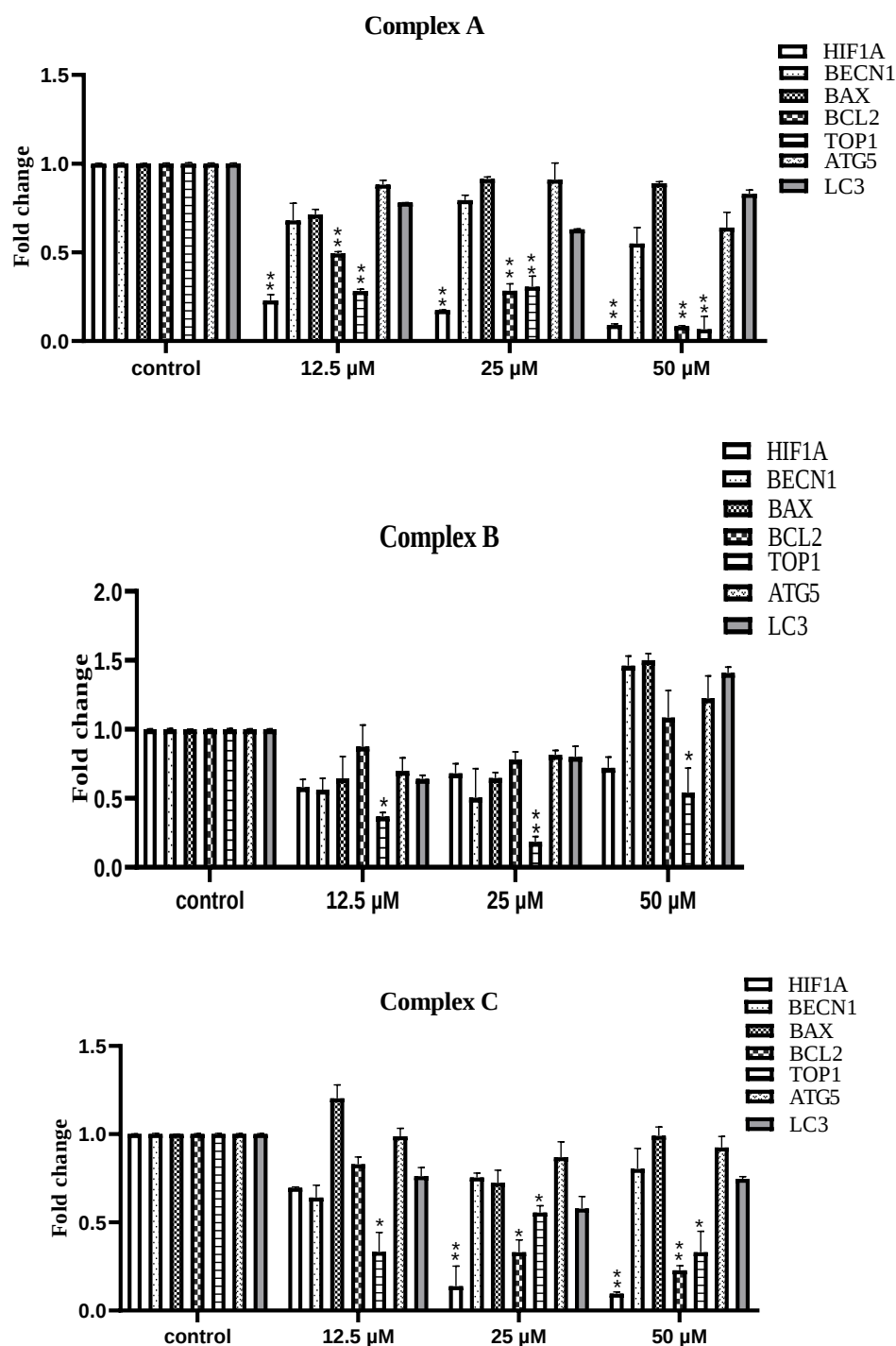


شکل ۲: منحنی درصد زنده ماندن سلول‌های SKBR3 پس از تیمار ۷۲ ساعته با کمپلکس‌های A، B و C و داروی کربوپلاتین

غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار کمپلکس C با کاهش معنی داری ($p < 0.001$) همراه بوده است. تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار کمپلکس‌های A و C به ترتیب با مقادیر $FC = 0.091$ و 0.096 بر بیان این ژن کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است. در بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، نتایج نشان داد. افزایش بیان ژن BCL2 پس از تیمار سلول‌ها تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار کمپلکس A و C به ترتیب با مقادیر $FC = 0.083$ و 0.228 در مقایسه با کنترل کاهش معنی داری ($p < 0.001$) را نشان می‌دهد، اما تغییری در بیان ژن BAX در هیچکدام از غلظت‌های مورد بررسی کمپلکس‌ها مشاهده نشد. بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر اتوفاجی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های مورد بررسی در مقایسه با بیان این ژن‌ها در سلول‌های فاقد تیمار دارویی تفاوت معنی داری نشان نداد.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌ها به روش Real-time PCR: همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیان هفت ژن دخیل در مسیرهای مختلف سلولی از جمله آپوپتوز (BAX و BCL2)، اتوفاجی (BECN1)، ATG5 و LC3، TOP1 و HIF1A پس از تیمار ۷۲ ساعته با کمپلکس‌های A، B و C با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت آماری در سطح $p < 0.05$ نسبت به سلول‌های بدون تیمار دارویی محاسبه شد.

بیان ژن TOP1 در تمامی غلظت‌های کمپلکس‌های مورد بررسی A، B و C کاهش معنی داری داشته است. قابل ذکر است بیان این ژن پس از تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار کمپلکس A در سطح $p < 0.001$ و با مقدار $Fold\ change\ (FC) = 0.067$ کاهش چشمگیری نسبت به کنترل داشته است. همچنین بیان ژن HIF1A پس از تیمار با تمامی غلظت‌های کمپلکس A و



شکل ۳: نمودار اثر تیمار ۷۲ ساعته ردهی سلولی SKBR3 با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار کمپلکس‌های A، B و C بر بیان ژن‌های HIF1A, ATG5, LC3, BECN1, BAX, BCL2, TOP1. تمامی نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ در نظر گرفته شده است. (* $p < 0.05$ و ** $p < 0.001$)

بحث

پذیرش بیشتر برای بیماران می‌باشند. خاصیت ضد سرطانی برخی داروها سال‌هاست که مشخص شده است و به همین دلیل استفاده از داروهای مناسب جهت درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۴).

امروزه مراکز مطالعات سرطان شناسی، در جستجوی عوامل ضد سرطان با ضریب اطمینان بالاتر و قابلیت

پس از کشف فعالیت ضد نئوپلاستی سیس پلاتین (سیس-دی-آمین دی کلریدو پلاتین-۲) در پایان دهه ۱۹۶۰، هزاران کمپلکس پلاتین برای فعالیت ضد سرطانی طراحی، سنتز و آزموده شدند اما تنها سه گونه از آنها سیس پلاتین، کربوپلاتین و اگزال پلاتین برای کاربرد بالینی در گستره جهانی مورد تأیید FDA قرار گرفتند (۲۵،۲۴).

هدف از این تحقیق بررسی اثر کمپلکس شیف بازهای پلاتین (II) بر روی رده سلولی سرطان پستان انسانی SKBR3 و بررسی عملکرد و اثرات آنها بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز و اتوفاژی بوده است. در این مطالعه از کربوپلاتین، به عنوان داروی استاندارد، جهت مقایسه کمپلکس‌های سنتز شده استفاده شد.

در این مطالعه با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT نشان داده شد که کمپلکس A دارای اثر کشندگی وابسته به دوز در سلول‌های سرطانی پستان می‌باشند. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، میزان IC_{50} پس از تیمار با کمپلکس A به طرز معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ نسبت به کربوپلاتین کاهش پیدا کرده است که بدین معنی است که دوز کمتری از این دارو جهت کشتن سلول‌های سرطانی لازم است. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که در اثر تیمار کمپلکس‌های مختلف مشتق از پلاتین بیان ژن TOP1 به صورت معنی‌داری در تمامی غلظت‌ها کاهش داشته است (شکل ۳).

TOP1 در سلول‌های تحت آپوپتوز در پاسخ به طیف گسترده‌ای از محرک‌ها، از جمله مهارکننده‌های آرسنیک تری اکسید (۲۶)، استاروسپورین (۲۷)، توبولین و و مهارکننده‌های توپوایزومراز II می‌تواند شناسایی شود. بسیاری از داروهای مهم ضدسرطان و ضدباکتری به واسطه توپوایزومرازها عمل می‌کنند. آنتی‌بیوتیک فلوروکینولون با ایجاد اختلال در عملکرد توپوایزومراز نوع ۲ در باکتری کار می‌کند (۲۸). در مطالعه‌ای توسط Depowski و همکاران (۲۰۰۰) بیان شد که ارتباط معنی‌داری از افزایش بیان TOP2A با متغیرهای شناخته

شده در سرطان پستان وجود دارد، که نشان دهنده نقش بالقوه آن به عنوان یک نشانگر پیش آگهی در این بیماران است (۲۹). Mahmoud و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان کردند که کمپلکس Cd(II) دارای فعالیت ضد میکروبی قوی است. آن‌ها فعالیت ضد سرطانی لیگاند شیف باز و کمپلکس‌های فلزی آن در سلول‌های سرطان MCF-7 بررسی کردند که در این بررسی کمپلکس Cr (III) فعالیت بالاتری نسبت به سایر کمپلکس‌ها و لیگاندها نشان می‌داد (۳۰).

بیان ژن HIF1A نیز در تمامی غلظت‌های کمپلکس A و غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار کمپلکس C از نظر آماری کاهش معنی‌داری داشته است. Roberts و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای با هدف بررسی سهم نسبی بیان ژن HIF1A (عامل القا-کننده هیپوکسی -۱) و نفوذ دارو به مقاومت به oxaliplatin بیان کردند که نفوذ دارو، سطح آسیب DNA و فرآیندهای وابسته به HIF1A، همه به مقاومت سلول‌های هیپوکسی در برابر اگزالی پلاتین کمک می‌کند (۳۱). در مطالعه حاضر بیان ژن HIF1A کاهش معنی‌داری در غلظت‌های بالایی از هر سه کمپلکس را نشان داد.

مسیر دیگری که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، مسیر آپوپتوز بود که بیان ژن‌های BAX و BCL2 مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد تغییرات بیان ژن BAX از نظر آماری معنی‌دار نبود اما کاهش بیان ژن BCL2 در کمپلکس A و C معنی‌دار بوده است. BCL2 یک فعال‌کننده ضد آپوپتوز است که در مسیر داخلی از آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری جلوگیری می‌کند. BAX یک فعال‌کننده آپوپتوز است و باعث ترشح سیتوکروم C و Smac-diablo می‌شود (۳۲). Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که شیف بازهای مشتق از piperidone/cyclohexanone می‌تواند در سلول‌های A549, SGC7901, HePG2, HeLa, K562, THP-1 and non-malignant LO2 از طریق افزایش

می‌شود (۴۰). در پاسخ به آسیب DNA، بیان ATG5 افزایش می‌یابد و باعث افزایش اتوفاژی، جلوگیری از فعال شدن کاسپاز و آپوپتوز می‌شود. ATG5 مسئول توقف G2/M بوسیله ی فسفوریلاسیون CDK1 و CHEK2، دو تنظیم کننده مهم توقف چرخه سلولی می‌باشد (۴۱، ۴۲). بیان تمامی ژن‌های فوق مرتبط با مسیر اتوفاژی در اثر مشتقات پلاتین معنی‌دار نبوده است. این نتایج نشان داد کمپلکس‌های سنتز شده ممکن است از مسیرهای دیگر اثر ضد سرطانی خود را ایفا کند.

محدودیت‌ها: با توجه به این که این مطالعه بر روی یک رده سلولی و به صورت برون تنی انجام شده است، نمی‌توان این نتایج را به شرایط درون تنی تعمیم داد. برای غلبه بر این محدودیت انجام مطالعات درون تنی ضرورت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج تیمار سلول‌ها با کمپلکس‌های شیف بازهای مشتق از پلاتین (II) در غلظت‌های مختلف نشان داد که کمپلکس A بیشترین میزان کشندگی را نسبت به دیگر داروهای مورد بررسی دارا می‌باشد. بررسی‌های ما نشان داد کمپلکس‌های سنتز شده از طریق مهار بیان ژن‌های TOP1 و HIF1A می‌تواند اثر کشندگی بر رده‌ی سلولی SKBR3 اعمال کند. همچنین کاهش بیان ژن BCL2 در اثر تیمار سلول‌ها با کمپلکس‌های مورد بررسی ممکن است حاکی از نقش آن‌ها در القای آپاپتوز باشد. با این حال، مطالعات بیشتری برای درک دقیق مکانیسم فعالیت‌های داروهای مشتق از پلاتین لازم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس خود را از سرکار خانم دکتر محبوبه اسلامی مقدم برای سنتز ترکیبات مورد استفاده اعلام می‌دارند.

بیان BAX و کاهش بیان BCL2 به طور موثر آپوپتوز سلول را افزایش دهد (۳۳).

مطالعات نشان داده‌اند اتوفاژی در پاسخ به درمان سرطان توسط کمک به افزایش مقاومت به درمان از سلول‌های توموری حمایت می‌کند. اتوفاژی می‌تواند هدف درمانی برای سلول‌های تومور باشد. ژن‌های انتخاب شده ژن‌هایی هستند که در مسیر اتوفاژی نقش کلیدی دارند و اختلال در بیان آن‌ها در بسیاری از سرطان‌ها دیده شده است (۳۴، ۳۵). بنابراین دانستن الگوی بیان این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی پستان، با توجه به اهمیت بالای این سرطان، می‌تواند زمینه‌ای را برای انجام سایر تحقیقات در جهت رسیدن به درمان‌های هدفمند فراهم کند. بدین‌منظور در تحقیق حاضر بیان سه ژن دخیل در مسیر اتوفاژی شامل BECN1 و LC3 و ATG5 بررسی شد. BECN1 به عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل می‌کند و یک واسطه ضروری در اتوفاژی است. BECN1 همچنین به علت برهمکنش با BCL2 می‌تواند با فعال کردن عملکرد نفوذپذیری میتوکندری و پروتئین‌های multidomain پروآپوپتوتیک باعث آپوپتوز شود. علاوه بر این، اعضای خانواده BCL2 می‌توانند با آزادسازی BECN1 از مهار آن توسط BCL2 / BCL2L1 در سطح شبکه آندوپلاسمی، اتوفاژی را فعال کنند (۳۶). نتایج نشان می‌دهد غیر فعال شدن ژن‌های خاصی از اتوفاژی مانند BECN1، منجر به گسترش تومور در موش‌ها می‌شود و بیان ژن BECN1 منجر به مهار تشکیل تومور پستان در مدل‌های موشی می‌شود (۳۷). مطالعاتی نیز نشان داد که ژن BECN1 به صورت یکنواخت در ۷۲٪ موارد سرطان پستان حذف می‌شود (۳۸). در سرطان سرویکس نیز BECN1 نقش مهمی در تنظیم فعالیت قوی ضد تومور دارد و افزایش بیان BECN1 در سلول‌های این سرطان، می‌تواند سیگنال‌های مرگ ناشی از داروهای ضد سرطان را افزایش دهد (۳۹). ATG5 یک alpha-helix است که در موارد آپوپتوز خود به خودی یا القا آپوپتوز دچار تجزیه N ترمینال

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. regional and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology*. 2017;3(4): 524-48.
2. Allahqoli L, Mazidimoradi A, Momenimovahed Z, Rahmani A, Hakimi Sevil, Tiznobaik A, et al. The Global Incidence, Mortality, and Burden of Breast Cancer in 2019: Correlation With Smoking, Drinking, and Drug Use. *Front Oncol*. 2022;12:921015.
3. Mahdavi N, Pakzad R, Ghoncheh M, Pakzad I, Moudi A, Salehiniya H. Spatial Analysis of Breast Cancer Incidence in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(S3):59-64
4. Noori-Dalooi MR, Ebadi N. Pharmacogenomics and cancer stem cells. *Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch*. 2015;25(1):1-5.(Persian)
5. Bahman Jahromi E, Jafaarnejad L, Vahdani M, Zolghadri S. Toxicity Effect of Bromoacetic Acid on MCF7 Breast Cancer Cell Line and Analysis of Expression of Apoptosis-Associated Genes. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease*. 2020; 13 (2):37-48
6. Zolghadri S, Ghanbariasad A, Fallahian F, Rahban M, Kalavani M, Bahman Jahromi E, et al. Anticancer activity of N-heteroaryl acetic acid salts against breast cancer; in silico and in-vitro investigation. *Molecular Biology Reports*. 2022; 49(1):363-72
7. Fakhr IM, Hamdy NA, Radwan MA, Ahmed YM. Synthesis of new bioactive benzothioephene derivatives. *Egypt. J. Chem*. 2004:201-9.
8. Tovrog BS, Kitko DJ, Drago RS. Nature of the bound oxygen in a series of cobalt dioxygen adducts. *Journal of the American Chemical Society*. 1976 ;98(17):5144-53.
9. Witkop B, Ramachandran LK. Progress in non-enzymatic selective modification and cleavage of proteins. *Peptides*. 1966 :165-75.
10. Brabec V, Kasparkova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug resistance updates*. 2002;5(3-4):147-61
11. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. *Drugs*. 1993;46(3): 360-77.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
13. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 45(3):528-37.
14. Eltayeb SA, Ciarimboli G, Beul K, Seno Di Marco G, Barz V. Role of Organic Cation Transporter 2 in Autophagy Induced by Platinum Derivatives. *Int J Mol Sci*. 2022 19;23(3):1090.
15. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(4):664-73.
16. Yu L, Strandberg L, Lenardo MJ. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy*. 2008;4(5): 567-73.
17. Bialik S, Kimchi A. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. *AdvExp Med Biol*. 2008; 615: 177-200.
18. Kumler I, Brunner N, Stenvang J, Balslev E, Nielsen DL. A systematic review on TOP1 inhibition in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2013;138(2):347-58
19. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IκB kinase-β, giving insight into hypoxia-

- by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*. 2010;17(5):421-33.
29. Depowski PL., Rosenthal S I, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase II α expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Modern Pathology*. 2000;13(5), 542-47.
 30. Mahmoud WH, Mohamed GG, El Sayed OY. Coordination compounds of some transition metal ions with new Schiff base ligand derived from dibenzoyl methane. Structural characterization, thermal behavior, molecular structure, antimicrobial, anticancer activity and molecular docking studies. *Applied Organometallic Chemistry*. 2018; 32(2), e4051.
 31. Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, et al. Contribution of HIF1A and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *British journal of cancer*. 2009;101(8):1290-7.
 32. Hardwick JM. Soane I., Multiple functions of Bcl2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2): a008722.
 33. Zhang L, Chen Q, Hou G, Zhao W, Hou Y. Hydroxyl-substituted double Schiff-base condensed 4-piperidone/cyclohexanones as potential anticancer agents with biological evaluation. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2019;34(1):264-71.
 34. Zarzynska JM. The importance of autophagy regulation in breast cancer development and treatment. *BioMed research international*, 2014.
 35. Han Y, Fan S, Qin T, Yang J, Sun Y, Lu Y, et al. Role of autophagy in breast cancer and breast cancer stem cells. *International journal of oncology*. 2018; 52(4), 1057-70.
 36. Valente G, Morani F, Nicotra G, Fusco N, Peracchio C, Titone R, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *BioMed research international*, 2014.
 - induced NF κ B activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(48):18154-9.
 20. Dehne N, Brüne B. HIF1A in the inflammatory microenvironment. *Experimental cell research*. 2009;315(11): 1791-7.
 21. Yin T, He S, Shen G, Wang Y. HIF1A dimerization inhibitor acriflavine enhances antitumor activity of sunitinib in breast cancer model. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2015; 22(3):139-45.
 22. Bazsefidpar, Eftekhari E, Zareian Jahromi M, Nikpoor AR, Eslami Moghadam M, Zolghadri S. In-vitro cytotoxicity and in-vivo antitumor activity of two platinum complexes with 1,3-dimethyl pentyl glycine ligand against breast cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2023; 241:112144
 23. Shiju C, Arish D, Bhuvanesh N, Kumaresan S. Synthesis, characterization and biological evaluation of Schiff base-platinum(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;145:213-22.
 24. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*. 2011;13(4):1-7.
 25. Reis-Filho JS, Lakhani SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease Genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Research*. 2003;5(6):1-7.
 26. Sordet O, Liao Z, Liu H, Antony S, Stevens EV, Kohlhagen G, et al. Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(32):33968-75.
 27. Sordet O, Khan QA, Plo I, Pourquier P, Urasaki Y, Yoshida A, et al. Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(48):50499-504.
 28. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning

37. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, et al. Beclin1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*. 2013;32(18):2261-72.
38. Sun Y, Liu JH, Jin L, Lin SM, Yang Y, Sui YX, et al. Over-expression of the BECN1 gene upregulates chemosensitivity to anti-cancer drugs by enhancing therapy-induced apoptosis in cervix squamous carcinoma CaSki cells. *Cancer letters*. 2010;294(2):204-10.
39. Saito H, Inazawa J, Saito S, Kasumi F, Koi S, Sagae S, et al. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21. 3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer research*. 1993;53(14):3382-5.
40. Codogno P, Meijer AJ. Atg5: more than an autophagy factor. *Nature cell biology*. 2006;8(10):1045-7.
41. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8:1124-32.
42. Simon HU, Friis R. ATG5: a distinct role in the nucleus. *Autophagy*. 2014;10(1):176-7.