

تهیه، شناسایی، ویژگی‌های ضدتومور، برهم‌کنش با DNA و تأثیر بار الکتریکی موجود روی نسبت‌های مولی گوناگون کمپلکس‌های Zn(II):Pd(II) در "ترکیب درمانی" آن‌ها

حسن منصوری ترشیزی*⁺، سمیرا جهانگیری، ملیحه بابایی زارچ، زهرا خدابخشی کنگان، فریده نرزشتی
گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

مصطفی حیدری مجد

گروه شیمی دارویی، بخش بیولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده: کمپلکس $[Pd(bpy)_2](NO_3)_2$ ، $Pd(II)$ با روشی جدید و کمپلکس جدید $[Zn(Gly)_3]$ ، $Zn(II)$ تهیه شدند. شناسایی این دو کمپلکس توسط روش‌های آنالیز عنصری، هدایت مولی و فناوری‌های طیف‌سنجی فروسرخ، رزونانس مغناطیس هسته و جذب الکترونی انجام شد. کمپلکس $Pd(II)$ به تنهایی و در حضور نسبت‌های مولی ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس $Zn(II)$ بر علیه سلول‌های سرطانی خون از نوع $K562$ امتحان شد. نتیجه‌ها، کاهش تکثیر این سلول‌ها را نوید داد. بنابراین، مطالعه‌های برهم‌کنش با DNA غده تیموس توسط طیف‌سنجی جذب الکترونی انجام شد. نتیجه‌های این مطالعه‌ها نشان داد، شاید کمپلکس $Pd(II)$ به دلیل مسطح بودن بین زوج بازهای آلی DNA قرار گرفته (ایتترکیلیت شده) و با تعاونی مثبت DNA را غیرطبیعی می‌کند. ایتترکیلیت شدن کمپلکس $Pd(II)$ با افزایش ۱، ۲ و ۳ برابر از کمپلکس $Zn(II)$ با یک مکانیسم ناشناخته‌ای کاهش می‌یابد که علت آن شاید کاهش بار مثبت در نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ این دو کمپلکس می‌باشد. در این فرایند، پارامترهای پیوندی و ترمودینامیکی تعیین شدند. این پارامترها به درک بهتر مکانیسم برهم‌کنش دارو با DNA کمک می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس $Pd(II)$ ، کمپلکس $Zn(II)$ ، سیتوتوکسیسیته، پارامترهای پیوندی، پارامترهای ترمودینامیکی، برهم‌کنش با DNA.

KEYWORDS: $Pd(II)$ complex; $Zn(II)$ complex; Cytotoxicity; Binding parameters; Thermodynamic parameters; DNA-binding.

مقدمه

عامل‌های مؤثر در ویژگی‌ها و صفت‌های نژادی نهفته است. در منطقه‌های گوناگون این پلیمر، فرایندهای حیاتی مانند

مطالعه‌ها نشان داده که DNA^(۱) (داکسی‌ریبونوکلیک اسید) پلیمری بسیار با اهمیت در هسته سلول‌ها است. در این پلیمر

*عده دار مکاتبات

+E-mail: hmtorshizi@hamoon.usb.ac.ir

(۱) Deoxyribonucleic acid

با DNA شود. از آنجایی که ساختار این کمپلکس مربع مسطح است، انتظار می‌رود افزون بر برهم‌کنش الکترواستاتیک، برهم‌کنش به روش اینترکیلیشن^(۳) نیز صورت گیرد [۱۷].

در این مطالعه‌ها، کمپلکس ضدتومور Pd(II) به تنهایی دارای دو بار مثبت و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ آن با کمپلکس Zn(II) به ترتیب دارای یک بار مثبت، بدون بار و یک بار منفی می‌باشند (شکل ۱). هدف از این مطالعه‌ها بررسی تأثیر بار اجزاء بر ویژگی‌های ضد تومور و برهم‌کنش آن‌ها با DNA است. شایان توجه است که اجزای تشکیل‌دهنده کمپلکس Zn(II) یعنی پتاسیم، عنصر روی و اسید آمینه گلايسين، هر سه برای سامانه‌های زنده شناخته شده هستند و شاید مشکل چندان در فرایند "ترکیب درمانی" ایجاد نکرده و بنابراین در سامانه فیزیولوژی عوارض جانبی کم‌تری از خود نشان خواهند داد. این مطالعه‌ها به کمک طیف‌سنجی UV-Vis^(۳) (طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش) انجام شد. افزوده می‌شود که در حد اطلاع ما از سایت‌های قابل دسترس، تأثیر بار الکتریکی کمپلکس‌های معدنی در ترکیب درمانی توسط دیگران انجام نشده است و شاید این دیدگاه جدید است.

بخش تجربی

مواد و تجهیزات

حلال‌های متانول و استونیتریل و واکنشگرهای گلايسين، باریم هیدروکسید، روی کلرید و پتاسیم کلرید از شرکت مرک آلمان خریداری شد. آب و استن تجاری قبل از مصرف تقطیر شدند. کمپلکس فلزی [Pd(bpy)Br₂] به عنوان پیش ماده به روش گزارش شده تهیه شد [۱۸]. واکنشگرهای نقره نترات، ۲،۲ - بی‌پیریدین، سدیم کلرید و دی‌اکسی‌ریبونوکلئیک اسید از غده تیموس گوساله، نوع ۱، با درجه پلیمریزاسیون بالا و تریس هیدروکسی متیل آمینو متان از شرکت آلدریچ خریداری شد.

طیف‌های فرسرخ کمپلکس‌ها به صورت قرص KBr در بازه $4000-400\text{ cm}^{-1}$ توسط دستگاه FT-IR^(۴) (تبدیل فوریه طیف‌سنجی فرسرخ)، شرکت شیمادزو، مدل ۴۶۰ ثبت شدند. طیف‌های رزونانس مغناطیس هسته کمپلکس‌ها توسط دستگاه FT-NMR^(۵) (تبدیل فوریه رزونانس مغناطیسی هسته)، شرکت بروکر، ۴۰۰ مگاهرتز، مدل Ac-Brocker در بازه ۱۲-۰ ppm

بیرون ریختن اطلاعات از ژن (بیان ژن)، عمل جهش‌زایی، سرطان‌زایی، رونویسی، همانندسازی و غیره رخ می‌دهد [۱]. می‌دانیم که امکان برهم‌کنش برخی از مولکول‌های شیمیایی با DNA وجود دارد که ترکیب‌های ضدتومور از آن جمله می‌باشند. این ترکیب‌ها پس از برهم‌کنش با DNA اثر ضدتومور خود را با اعمال تغییرها در کنفورماسیون DNA بروز داده و در نتیجه آنزیم‌های مؤثر در همانندسازی، ناحیه تغییر یافته را تشخیص نداده و روند رونویسی مختل و بدین طریق از تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌شود. بنابراین، طراحی مولکول‌هایی که بتوانند با DNA برهم‌کنش مؤثر داشته و از همانندسازی آن جلوگیری کنند، پایه و اساس مبارزه با سرطان می‌باشد [۳، ۲]. در این زمینه، مطالعه‌های بررسی نوع پیوند بین مولکول‌های شیمیایی و DNA به منظور پیدا کردن ترکیب‌هایی مناسب برای درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است [۶ - ۴]. دسته‌ای از این مولکول‌ها، کمپلکس‌های فلزی می‌باشند [۸، ۷]. سردسته این کمپلکس‌های فلزی، سیس پلاتین، [Pt(NH₃)₂Cl₂] است که به عنوان اولین ترکیب ضد سرطانی وارد بازار شد [۹]. اما به علت عوارض جانبی [۱۰] و حلالیت ضعیف در آب، پژوهش‌ها جهت رفع این مشکل‌ها همچنان ادامه دارد. تعداد زیادی از کمپلکس‌های فلزی مورد بررسی قرار گرفته که از بین آنها کمپلکس‌های پالادیوم ویژگی‌های ضدتومور چشمگیری نشان داده‌اند [۱۴ - ۱۱]. کمپلکس‌های پالادیوم تک هسته‌ای با لیگاند ۲'و ۳'-بی‌پیریدین با ویژگی‌های ساختاری خاص، دارای ویژگی‌های ضدتوموری مناسبی هستند. این ویژگی‌ها می‌تواند به علت نزدیک بودن شیمی پالادیوم به پلاتینیوم باشد [۱۵]. با توجه به این که امراضی مانند عفونت‌ها، ورم مفاصل و به ویژه سرطان، هر یک مجموعه‌ای از امراض مرموزند که با هم بروز می‌کنند، یکی از روش‌های مداوا "ترکیب درمانی"^(۱) یعنی مداوای همزمان توسط بیش از یک دارو می‌باشد [۱۶].

در این کار پژوهشی، کمپلکس بیس - ۲'و ۳'-بی‌پیریدین پالادیوم (II) نترات با روشی جدید تهیه شد. این کمپلکس دارای دو لیگاند دو دندانه نیتروژن دهنده مسطح می‌باشد، بنابراین در محیط فیزیولوژی پایدار بوده و تا رسیدن به DNA سلول، ساختار خود را حفظ می‌کند. با وجود آب گریز بودن لیگاندها، کمپلکس به علت داشتن دو بار مثبت در آب محلول است که ممکن است باعث برهم‌کنش الکترواستاتیک

(۱) Combination therapy

(۲) Intercalation

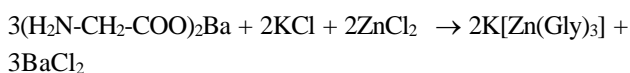
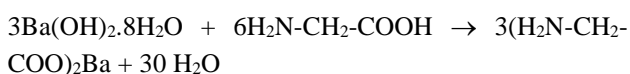
(۳) Ultraviolet-Visible spectroscopy

(۴) Fourier Transform Infrared spectroscopy

(۵) Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance

روش تهیه کمپلکس $[K[Zn(Gly)_3]]$ ، پتاسیم تریس-گلايسیناتو روی (II)

۳ میلی‌مول (۰/۹۵ گرم) $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ و ۶ میلی‌مول (۰/۴۵ گرم) گلايسین در ۱۳ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به مدت ده دقیقه هم زده شد. پس از تشکیل $Ba(Gly)_2$ ، ۲ میلی‌مول (۰/۴۱ گرم) $ZnCl_2$ و ۲ میلی‌مول (۰/۲۳ گرم) KCl به مخلوط واکنش افزوده شد. ترکیب شونده‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۶۰-۵۵ درجه سلسیوس تحت رفلکس هم زده شدند. پس از خنک شدن، رسوب $BaCl_2$ با کاغذ واتمن ۴۲ صاف شد (وزن رسوب حدود ۰/۵۰ گرم بود و با آنچه انتظار می‌رفت به تقریب مطابقت داشت). مادر آب بیرنگ شفاف در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به آرامی تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر تبخیر شد. سپس صاف و در ظرف درب بسته‌ای تحت نفوذ استن قرار گرفت. پس از یک هفته بلورهای ریزی تشکیل شدند. مایع روی بلورها به آرامی سرریز و پس از شستن بلورها با استن، در دمای ۴۵ درجه سلسیوس خشک شدند. وزن بلورها ۰/۵۱ گرم، راندامان فراورده ۷۸/۱۱ درصد و معادله واکنش‌ها به شرح زیر است:



مطالعه‌های سیتوتوکسیک

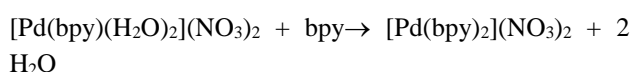
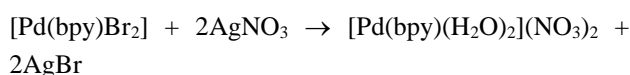
این مطالعه‌ها به روشی که پیش‌تر گزارش کردیم انجام شد [۱۹]. در این آزمایش ابتدا سلول‌های K_562 در محیط کشت RPMI^(۱) دارای ۱۰٪ FBS^(۲) (سرم جنین گاو) و ۱۰۰ واحد پنیسیلین/استرپتومایسن نسبت به هر میلی‌لیتر (جهت جلوگیری از رشد باکتری) در انکوباتور CO_2 دار و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت کافی رشد داده شدند. سپس سلول‌های رشد داده شده به شتابک‌های ۹۶ خانه (برای هر خانه ۱۰۰۰۰ سلول) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، ۰، ۱۴، ۲۸، ۵۶، ۱۱۲ و ۲۰۰ میکرومولار محلول کمپلکس $Pd(II)$ به پیلت‌ها اضافه شد. مجاورت کمپلکس و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. سپس محتویات شتابک‌ها خارج و با افزودن رنگ MTT^(۳) تعداد سلول‌های زنده محاسبه شد. این آزمایش برای مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ از کمپلکس‌های $Zn(II):Pd(II)$ نیز تکرار شد.

با استفاده از استاندارد داخلی ترامتیل سیلان ثبت شدند. طیف‌های جذب الکترونی توسط دستگاه UV-Vis شرکت جاسکو، مدل ۸۵۰، هدایت الکتریکی مولی کمپلکس توسط دستگاه هدایت سنج WTW، F200 و تجزیه عنصری ترکیب‌ها توسط دستگاه آنالیز عنصری Herause CHNO-RAPID انجام شد.

روش تهیه ترکیب‌ها

روش تهیه کمپلکس $[Pd(bpy)_2](NO_3)_2$ بیس-۲،۲-بی‌پیریدین پالادیم (II) نیترات

۱/۲۷ گرم (۳ میلی‌مول) $[Pd(bpy)Br_2]$ در ۱۶۰ میلی‌لیتر مخلوط ۳:۱ آب و استن سوسپانسیون شد و ۱/۰۲ گرم (۶ میلی‌مول) $AgNO_3$ به آن افزوده شد. ترکیب شونده‌ها در تاریکی و در دمای ۵۵ درجه سلسیوس تحت بازروانی به مدت ۷ ساعت و سپس در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت جهت تکمیل واکنش هم زده شدند. رسوب‌های $AgBr$ توسط کاغذ واتمن ۴۱ و سپس واتمن ۴۲ صاف شد (وزن $AgBr$ ۱/۱۲ گرم بود و با آنچه انتظار میرفت مطابقت داشت). به محلول زرد شفاف زیر صافی که دارای $[Pd(bpy)(H_2O)_2](NO_3)_2$ بود، ۰/۴۶۸ گرم (۳ میلی‌مول) لیگاند ۲،۲-بی‌پیریدین حل شده در ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر استن، در تاریکی، به آرامی و در حالی که همزده می‌شد افزوده شد. واکنشگرها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و تحت بازروانی به مدت ۲ ساعت برای تکمیل واکنش هم زده شد. هم‌زدن در دمای ۵۵ درجه سلسیوس جهت تبخیر حلال و خشک شدن ادامه یافت. رسوب‌های به نسبت مرطوب، پودر شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. سپس رسوب‌ها در ۸۰ میلی‌لیتر مخلوط ۱:۱ استونیتربیل و متانول در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حل، صاف و بی‌درنگ در ظرف شیشه‌ای با درب بسته تحت نفوذ دی اتیل اتر قرار گرفت. پس از چهار روز، بلور تشکیل شد که مادر آب روی آن سرریز و بلورها را با استن شسته و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شدند. وزن بلورها ۰/۹۲ گرم، راندامان کار ۵۶/۵۳ درصد و معادله واکنش‌ها به شرح زیر است:



مطالعه‌های برهم‌کنش DNA با کمپلکس Pd(II) مخلوط نسبت‌های**استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II)** **غیرطبیعی کردن DNA**

به هر یک از دو سل نمونه و مرجع $1/8$ میلی لیتر بافر تریس افزوده شد. 25 میکرولیتر از سل نمونه برداشته و به همان مقدار DNA اضافه شد. این مخلوط به آهستگی تکان داده شد تا یکنواخت شود. جذب آن در طول موج 260 نانومتر (برای DNA) و 640 نانومتر (برای تعیین میزان کدورت در محتویات سل) ثبت شد. سپس به هر دو سل نمونه و مرجع، 25 میکرولیتر از محلول کمپلکس Pd(II) با غلظت 10^{-3} مولار افزوده و پس از نگهداری در دمای 27 درجه سلسیوس به مدت 3 دقیقه، جذب آن در دو طول موج یاد شده ثبت شد. افزایش محلول کمپلکس با همین حجم آن قدر تکرار شد تا اختلاف جذب‌ها یکسان شود. این آزمایش در دمای 37 درجه سلسیوس نیز تکرار شد. سرانجام منحنی جذب‌ها در دو دما در مقابل غلظت‌ها به صورت جداگانه رسم شد [۱۹]. این آزمایش برای مخلوط نسبت‌های استوکیومتری $1:1$ ، $2:1$ و $3:1$ از کمپلکس Pd(II) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای 27 و 37 نیز تکرار شد.

تیتراسیون DNA توسط کمپلکس و رسم نمودار اسکاچارد

این آزمایش در دو مرحله انجام شد.

مرحله اول: سه گروه 7 تایی لوله آزمایش از 1 تا 7 شماره‌گذاری شد. الف) در گروه اول به هر لوله $1/2$ میلی لیتر محلول کمپلکس Pd(II) با غلظت 10^{-4} مولار و $1/3$ میلی لیتر بافر افزوده شد. ب) در گروه دوم به ترتیب 0.01 ، 0.02 ، 0.03 ، 0.04 ، 0.05 ، 0.06 و 0.08 میلی لیتر محلول DNA با غلظت 5×10^{-5} مولار به لوله‌ها افزوده و کلیه لوله‌ها توسط بافر به حجم $2/5$ میلی لیتر رسانیده شد. ج) در گروه سوم مقدار DNA همانند گروه دوم با این تفاوت که به کلیه لوله‌ها $1/2$ میلی لیتر محلول کمپلکس Pd(II) افزوده و سپس توسط بافر به حجم $2/5$ میلی لیتر رسانیده شد. درب لوله‌ها بسته شد و به مدت 4 ساعت، در دمای 27 درجه سلسیوس، جهت تکمیل برهم‌کنش نگهداری شد. سپس جذب آن‌ها (A) در بیشینه طول موج کمپلکس Pd(II) (312 نانومتر، جدول ۲) ثبت شد. تغییرهای جذب (ΔA) برای لوله‌های هم شماره از سه سری، با استفاده از رابطه $A_{\text{ع}} = A_{\text{ف}} + \Delta A$ به دست آمد. نمودار $1/\Delta A$ بر حسب $1/[DNA]$

رسم شد. از برون‌یابی نمودار خطی (محل تقاطع نمودار با محور Y)، ΔA_{max} (بیشینه جذب زمانی که بیشتر کمپلکس فلزی به DNA متصل شده یا جایگاه‌های DNA از کمپلکس اشباع شده‌اند) به دست آمد که در مرحله دوم استفاده شد.

مرحله دوم: در این مرحله نیز سه گروه 7 تایی لوله آزمایش از 1 تا 7 شماره‌گذاری شد. الف) در سری اول به هر لوله 0.05 میلی لیتر محلول DNA با غلظت 3×10^{-3} مولار افزوده و حجم آن توسط بافر به $2/5$ میلی لیتر رسانیده شد. ب) در گروه دوم به ترتیب 0.04 ، 0.05 ، 0.06 ، 0.07 ، 0.08 ، 0.09 و 1 میلی لیتر از محلول کمپلکس Pd(II) با غلظت 10^{-4} مولار افزوده و حجم آن توسط بافر به $2/5$ میلی لیتر رسانیده شد. ج) در گروه سوم مقدار محلول کمپلکس Pd(II) همانند گروه دوم با این تفاوت که به کلیه لوله‌ها 0.05 میلی لیتر محلول DNA اضافه سپس حجم آن‌ها توسط بافر به $2/5$ میلی لیتر رسانیده شد. درب لوله‌ها مسدود و به مدت 4 ساعت، در دمای 27 درجه سلسیوس، جهت تکمیل برهم‌کنش نگهداری شد. سپس جذب هر کدام در بیشینه طول موج کمپلکس Pd(II) (312 نانومتر) ثبت شد. در این مرحله نیز مقدارهای ΔA همانند مرحله اول محاسبه شد. سپس غلظت کمپلکس پیوند شده به DNA، $[L]_b$ ، در هر مجموعه از رابطه $[L]_b = \Delta A \times [L]_f / \Delta A_{\text{max}}$ که در آن $[L]_f$ غلظت کل کمپلکس در هر مجموعه بر حسب میلی مولار می‌باشد، به دست آمد. همچنین $[L]_f$ ، غلظت کمپلکس آزاد در هر مجموعه، از رابطه $[L]_f = [L]_t - [L]_b$ به دست آمد. در این مرحله مقدارهای \bar{v} تجربی را اسکاچارد به صورت رابطه $\bar{v} = [L]_b / [DNA]_t$ تعریف کرد. با رسم نمودار مقدارهای $\bar{v} / [L]_f$ بر حسب مقدارهای تجربی \bar{v} نمودار اسکاچارد تجربی به دست آمد [۲۰]. از روی نوع نمودار می‌توان به طبیعت برهم‌کنش پی برد. به این صورت که اگر گودی نمودار رو به پایین باشد، نشان دهنده این است که اتصال کمپلکس به یک جایگاه در DNA، تمایل جایگاه‌های دیگر جهت پیوند شدن را کاهش می‌دهد (ضد متعاون)، گودی رو به بالا، افزایش می‌دهد (متعاون) و خط راست، تغییری ایجاد نمی‌کند (غیرمتعاون).

با توجه به اهمیت \bar{v} و در ادامه مطالعه‌های یاد شده، هیل [۲۱] وابستگی \bar{v} را به پارامترهای پیوندی متعدد در نظر گرفت و معادله معروف خود را به صورت $\bar{v} = g(K[L]_f)^n / (1 + (K[L]_f)^n)$ اثبات نمود. مقدارهای \bar{v} در نمودار اسکاچارد مقدارهای تجربی و

هدایت الکتریکی کمپلکس‌ها در محلول آبی با غلظت

10^{-4} مولار با استفاده از آب دوبار تقطیر اندازه‌گیری شد. با جایگزینی این مقادارها در معادله (۱)، هدایت مولی (λ) آن‌ها محاسبه شد. با مقایسه آن‌ها با هدایت مولی ترکیب‌های گزارش شده [۲۴] مشخص شد که هدایت مولی کمپلکس Pd(II) و Zn(II) به ترتیب با هدایت مولی الکترولیت‌های ۲:۱ و ۱:۱ مطابقت دارند (جدول ۲).

$$\lambda = \frac{0.001 \times \text{ثابت سل} \times (\text{هدایت آب مقطر} - \text{هدایت کمپلکس})}{\text{غلظت کمپلکس}} \quad (1)$$

بررسی یافته‌های تجزیه عنصری

نتیجه‌های یافته‌های تجزیه عنصری کمپلکس‌های تهیه شده در جدول ۳ آورده شده است. این نتیجه‌ها با ساختارهای پیشنهادی مطابقت دارند.

بررسی طیف زیر قرمز کمپلکس‌ها

در کمپلکس Pd(II) گروه‌های عاملی عمده که در IR^(۲) (ناحیه فروسرخ) فعالند مربوط به لیگاند ۲'و۲- بی‌پیریدین می‌شوند. فرکانس کششی این گروه‌ها در نواحی 3480 و 3100 cm^{-1} به C-H، 1544 – 1600 cm^{-1} به C=N و 752 cm^{-1} به C=C نسبت داده می‌شوند که با آنچه در منابع گزارش شده، مطابقت دارند [۲۵]. در این طیف یک نوار در ناحیه 1380 cm^{-1} دیده شد که به فرکانس کششی گروه NO_3^- کوردینه نشده نسبت داده می‌شود [۲۶].

در طیف گلاسیسین آزاد دو نوار در نواحی 1414 و 1600 cm^{-1} دیده می‌شود. این دو نوار در طیف کمپلکس Zn(II) در ناحیه‌های 1401 و 1590 cm^{-1} ظاهر شده‌اند. جابه‌جایی موقعیت این دو نوار در طیف گلاسیسین آزاد نسبت به کمپلکس Zn(II) نشان دهنده کوئوردینه شدن به صورت دو دندان می‌باشد [۲۸، ۲۷].

بررسی طیف $^1\text{H NMR}$

طیف‌های $^1\text{H NMR}$ کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II) به ترتیب در حلال‌های DMSO-d_6 و D_2O توسط دستگاه 400 MHz ثبت شد.

مقدارهای $\bar{\nu}$ به دست آمده از معادله هیل مقادارهای نظری می‌باشند (روشن است که هرچه این مقادارها همخوانی بیشتری داشته باشند، یکدیگر را بیش‌تر تأیید کرده یعنی نتیجه‌های تجربی ما درست‌ترند). در رابطه هیل، n ضریب هیل، K ثابت پیوندی کمپلکس به DNA و g تعداد جایگاه‌های پیوندی برای 1000 نوکلئوتید می‌باشد. ضریب هیل معرف کیفی میزان تعاونی است. یعنی $n > 1$ ، سامانه متعاون، $n < 1$ ، سامانه ضدمتعاون و $n = 1$ سامانه غیرمتعاون است. سپس با جایگزین کردن مقادارهای تجربی $\bar{\nu}$ و $[L]_f$ در معادله هیل معادله‌هایی شامل سه مجهول n ، K و g به دست آمد که با استفاده از نرم افزار یوریکا^(۱) حل شد [۲۲]. این مقادارها، مقادارهای تئوری n ، K و g می‌باشد. حال با قرار دادن دوباره آن‌ها و مقادارهای $[L]_f$ در معادله هیل، مقادارهای تئوری $\bar{\nu}$ به دست آمد که با مقادارهای تجربی قابل مقایسه است. با رسم نمودار $[L]_f / \bar{\nu}$ برحسب مقادارهای $\bar{\nu}$ نظری نمودار اسکاچارد نظری نیز به دست می‌آید. این دو نمودار (شکل ۶) یکدیگر را تأیید می‌کنند. آزمایش دو مرحله‌ای بالا برای کمپلکس Pd(II) در دمای 37 درجه سلسیوس تکرار شد. همچنین برای هر یک از مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ از کمپلکس Pd(II) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای 27 و 37 درجه سلسیوس نیز انجام شد.

نتیجه‌ها و بحث

شناسایی کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II)

بررسی طیف‌های جذب الکترونی

یافته‌های مربوط به طیف جذب الکترونی در جدول ۱ گردآوری شد. در طیف جذب الکترونی کمپلکس Pd(II) سه نوار جذبی دیده شد. این سه نوار به انتقال‌های درون لیگاندی $\pi \rightarrow \pi^*$ مربوط به ۲'و۲- بی‌پیریدین نسبت داده می‌شوند [۱۷]. افزوده می‌شود برای این کمپلکس انتقال‌های CT و $d \rightarrow d$ دیده نشد. از سویی نوارهای جذبی یون همراه NO_3^- که به دلیل $n \rightarrow \pi^*$ است (300 ، 240 و 220 نانومتر) بایستی با انتقال‌های کمپلکس همپوشانی نموده باشد.

در طیف جذبی الکترونی کمپلکس Zn(II) دو نوار دیده شد که شاید مربوط به انتقال‌های $n \rightarrow \pi^*$ لیگاند گلاسیسین می‌باشند [۲۳]. Zn(II) با آرایش الکترونی d^{10} ، انتقال‌های الکترونی $d \rightarrow d$ ندارد و برای این کمپلکس نوار انتقال بار دیده نشد.

بررسی نتیجه‌های هدایت سنجی

در طیف کمپلکس Pd(II) پرتون‌های دو لیگاند ۲' و ۳- بی‌پیریدین در نواحی ppm ۸/۸۱، ۸/۷۲، ۸/۵۰ و ۷/۹۲ با سطح زیر سیگنال جذبی

جدول ۱- یافته‌های مربوط به طیف UV-Vis کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II) در محیط مائی.

کمپلکس	غلظت (مولار)	نوار I	نوار II	نوار III
		$\lambda(-\log\epsilon)$	$\lambda(-\log\epsilon)$	$\lambda(-\log\epsilon)$
[Pd(bpy) ₂](NO ₃) ₂	۵×۱۰ ^{-۵}	۳۱۲(۴,۵۳)	۲۳۰(۴,۳۵)	۲۱۶(۴,۳۸)
K[Zn(Gly) ₃]	۵×۱۰ ^{-۲}	۲۱۰(۱۱,۸)	۲۰۵(۸,۴۰)	-

(۲) Infrac

جدول ۲- یافته‌های به دست آمده از هدایت مولی کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II).

کمپلکس	غلظت (مولار)	هدایت کمپلکس	هدایت آب	هدایت مولی کمپلکس
[Pd(bpy) ₂](NO ₃) ₂	۱۰ ^{-۴}	۲۵,۴	۱,۲	۲۴۲
K[Zn(Gly) ₃]	۱۰ ^{-۴}	۱۴	۱,۲	۱۲۸

جدول ۳- نتیجه‌های تجزیه عنصری کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II).

کمپلکس	جرم ملکولی (گرم/مول)	درصد کربن		درصد هیدروژن		درصد نیتروژن	
		تجربی	تئوری	تجربی	تئوری	تجربی	تئوری
[Pd(bpy) ₂](NO ₃) ₂	۵۲۴	۴۴,۲۸	۴۴,۲۸	۲,۹۵	۲,۹۵	۱۵,۵۰	۱۵,۵۰
K[Zn(Gly) ₃]	۳۶۷	۱۹,۶۱	۱۹,۶۳	۳,۲۹	۳,۲۶	۱۱,۴۴	۱۱,۴۱

همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده، در حضور کمپلکس Pd(II) (▲) به تنهایی و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری

۱:۱ (●)، ۲:۱ (×) و ۳:۱ (○) با کمپلکس Zn(II) درصد زنده ماندن سلول‌های^(۱) سرطانی K₅₆₂ موجود در محیط کشت به مقدار چشمگیری کاهش می‌یابد. مقدارهای IC₅₀ این ترکیب‌ها با افزایش نسبت کمپلکس Zn(II) به کمپلکس Pd(II) نیز افزایش می‌یابند (جدول ۴). این افزایش نشان دهنده: الف) کاهش در فعالیت سیتوتوکسیسیستی (ب) برهم‌کنش هر دو کمپلکس با DNA و تأثیر منفی کمپلکس Zn(II) در ویژگی‌های ضدتومور کمپلکس Pd(II) می‌باشد. در حد اطلاع ما این‌گونه تأثیری در منابع گزارش نشده است. به نظر می‌رسد: ۱) کمپلکس Pd(II) که دارای دو بار مثبت است، آسان‌تر جذب سطحی DNA که دارای بار منفی است شده و با نزدیک شدن به DNA، به دلیل مسطح و آروماتیک بودن در DNA اینترکیلیت می‌شود. ۲) با کاهش بار مثبت در مخلوط‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ (شکل ۱) دو امکان وجود دارد: کمپلکس Zn(II) با DNA برهم‌کنش داشته و این

به‌ترتیب ۱/۰۰، ۱/۰۰، ۱/۰۱ و ۱/۰۱ که با نسبت پرتون‌ها (۴:۴:۴) در مولکول مطابقت داشت، رزونانس نمود. این پیام‌ها در مقایسه با ۲' و ۳- بی‌پیریدین آزاد به ترتیب ppm ۰,۱۱، ۰,۳۵، ۰,۶ و ۰,۵۲ به طرف میدان ضعیف‌تر جابه‌جا شده‌اند، که نشان دهنده کوردینه شدن این دو لیگاند به مرکز Pd می‌باشد [۲۹، ۳۰].

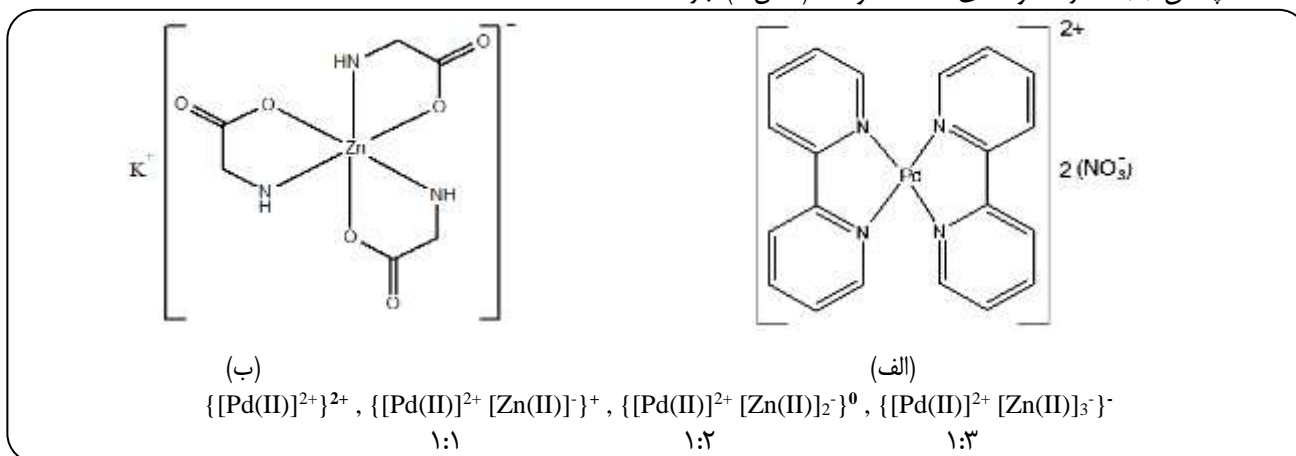
نظر به این که طیف ¹H NMR کمپلکس Zn(II) در حلال D₂O ثبت شد، پروتون‌های NH₂ وجود ندارند (با D از D₂O تعویض شدند). بنابراین تنها یک پیام در ناحیه ppm ۳,۲ دیده می‌شود که به پروتون‌های گروه متیلن (CH₂) گلیاسین‌های کوردینه به Zn نسبت داده می‌شود [۳۱].

با توجه به یافته‌های IR، ¹H NMR، UV-Vis و همچنین هدایت سنجی و تجزیه عنصری ساختار پیشنهادی کمپلکس‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی نتیجه‌های سیتوتوکسیستی

منفی مخلوط‌ها نیز افزایش می‌یابد. این بار منفی با بار منفی

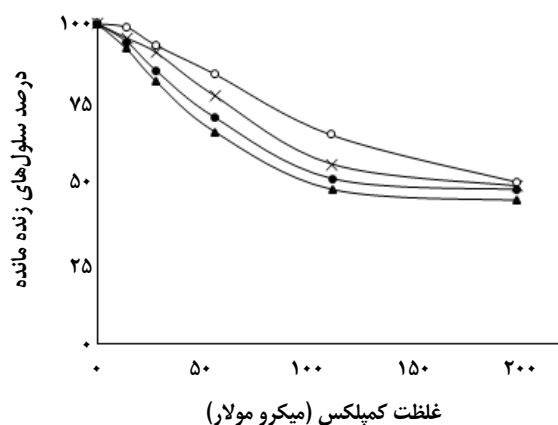
برهم‌کنش نظم بازهای آلی DNA را دچار اختلال کرده و کمپلکس Pd(II) نمی‌تواند به راحتی در DNA اینترکیلیت شود و یا با افزایش غلظت کمپلکس Zn(II) در مخلوط‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ (شکل ۱) بار



شکل ۱- ساختار پیشنهادی یون کمپلکس‌های الف) $[Pd(bpy)_2]^{2+}$ ، ب) $[Zn(Gly)_3]^{-}$ و ج) برآیند بار روی کمپلکس‌ها در مخلوط این دو کمپلکس.

بررسی نتیجه‌های آزمایش‌های برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) غیرطبیعی کردن DNA

منحنی تغییرهای جذب DNA، Abs، در مقابل افزایش غلظت کمپلکس، $[L]_t$ ، برای کمپلکس Pd(II) (a) و هر یک از مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس رسم شد (شکل ۳). همان‌گونه که در منحنی شکل ۳ (a) دیده می‌شود، با افزایش غلظت کمپلکس Pd(II)، جذب محلول DNA در دو دمای ۲۷ (●) و ۳۷ (○) درجه سلسیوس افزایش می‌یابد. این مشاهده نشان می‌دهد که در اثر این برهم‌کنش کانفورماسیون DNA تغییر کرده و بازهای DNA به مقدار بیش‌تری در معرض نور UV-Vis قرار گرفته و جذب افزایش یافته است. اما در منحنی‌های شکل ۴ (b)، (c) و (d) که در آن‌ها به جای کمپلکس Pd(II)، مخلوط‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ از این کمپلکس با کمپلکس Zn(II) به DNA افزوده شده، جذب DNA در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس کاهش نشان می‌دهد. این مشاهده نمایان‌گر این است که: الف) کمپلکس Zn(II) نیز با DNA برهم‌کنش دارد و ب) تغییرهای صورت‌بندی DNA در حضور کمپلکس Zn(II) به گونه‌ای است که بازهای آلی آن بیشتر مخفی شده و نور UV-Vis کم‌تری به آن می‌رسد تا جایی که جذب آن به صفر میل کرده و شاید DNA رسوب می‌کند.



شکل ۲- درصد زنده ماندن سلول‌های سرطان خون از نوع K562 در حضور کمپلکس Pd(II) (▲)، مخلوط کمپلکس‌های Pd(II) و Zn(II) با نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (●)، ۲:۱ (×) و ۳:۱ (○) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

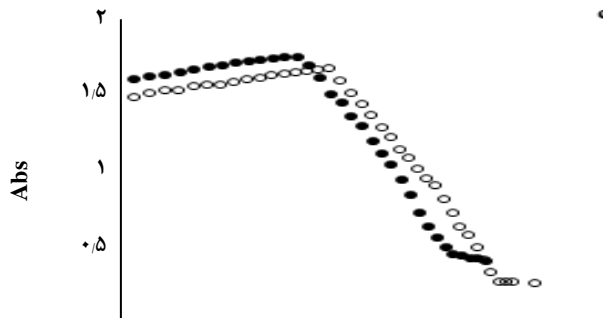
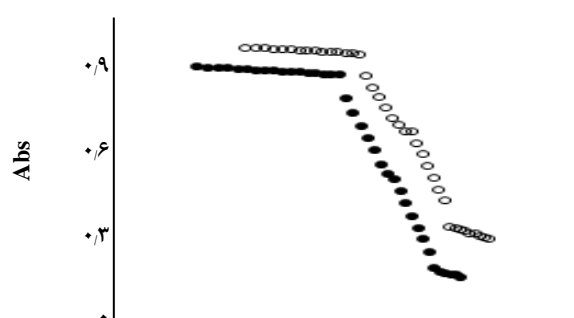
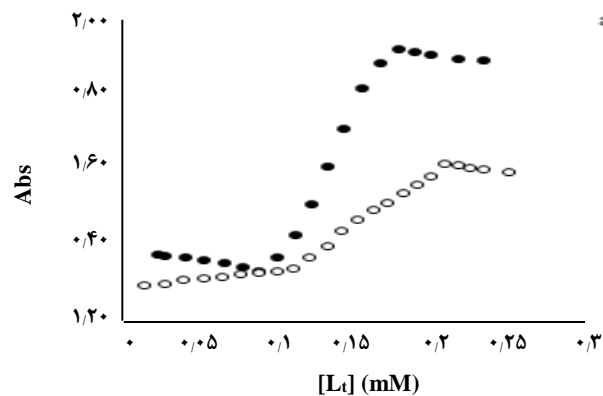
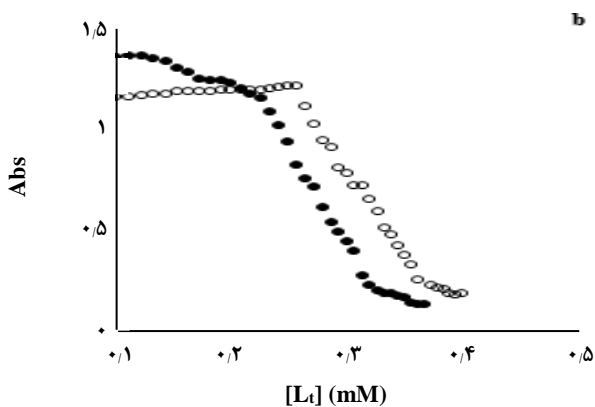
گروه‌های فسفات در سطح DNA دافعه داشته و بنابراین شدت برهم‌کنش را کاهش می‌دهد. (۳) حتی در نسبت ۳:۱ که برآیند بار مخلوط کمپلکس منفی است، باز هم با DNA برهم‌کنش می‌کنند، اما از شدت کم‌تری برخوردار است زیرا در این نسبت مقدار IC_{50} از سایر نسبت‌ها بیش‌تر است.

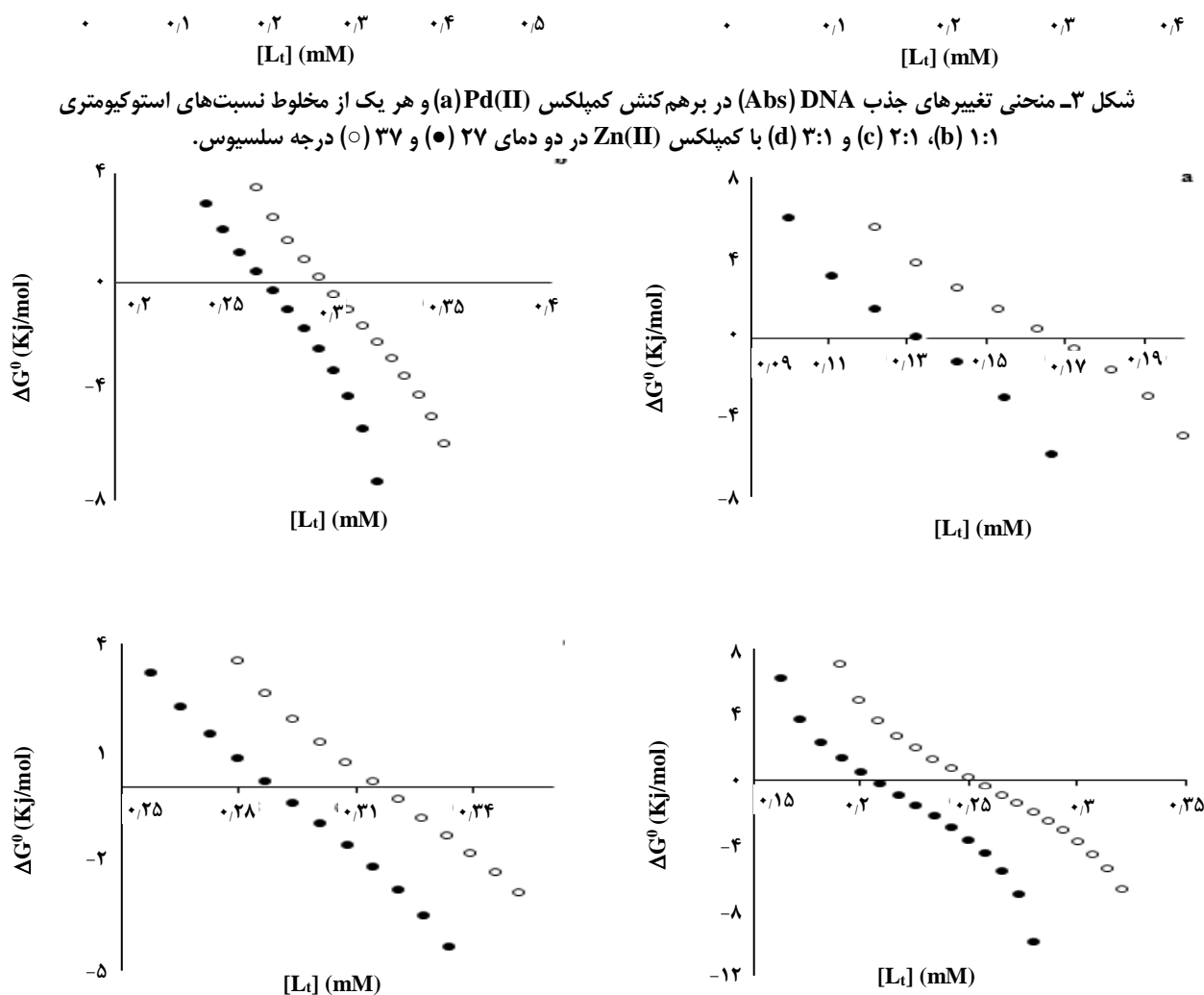
الف) با افزایش دما، $[L]_{1/2}$ افزایش یافته، یعنی در هر یک از سامانه‌های چهارگانه، افزایش دما باعث کاهش قدرت غیرطبیعی کنندگی کمپلکس‌ها شده است. ب) کمپلکس Pd(II) به تنهایی کم‌ترین مقدار $[L]_{1/2}$ را دارد و با افزایش نسبت مخلوط آن با کمپلکس Zn(II)

مقدارهای $[L]_{1/2}$ ، غلظتی از کمپلکس که باعث تغییر کنفورماسیون ۵۰ درصد DNA از ساختار طبیعی می‌شود، از منحنی‌های شکل ۳ در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس، به دست آمد (جدول ۴). این مقادارها نشان می‌دهد که:

جدول ۴- نتیجه‌های مطالعه‌های سیتوتوکسیسیته و برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) (a) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری (b) ۱:۱، (c) ۲:۱ و (d) ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) با DNA.

کمپلکس	Pd(II)		Pd(II):Zn(II) ۱:۱		Pd(II):Zn(II) ۱:۲		Pd(II):Zn(II) ۱:۳	
	طول موج بیشینه (nm)	۳۱۲		۳۰۶		۳۰۹		۳۰۶
دما (سلسیوس)	۲۷	۳۷	۲۷	۳۷	۲۷	۳۷	۲۷	۳۷
IC_{50} (میلی مولار)	-	۱۰۱	-	۱۲۵	-	۱۸۵	-	۲۰۰
$[L]_{1/2}$ (میلی مولار)	۰٫۱۳	۰٫۱۶	۰٫۲۹	۰٫۳۱	۰٫۲۱۶	۰٫۲۵	۰٫۲۹	۰٫۳۱
$\Delta G_{(H_2O)}^\circ$ (kJ/mol)	۲۱٫۵۰	۲۰٫۰۵	۳۱٫۱۴	۲۹٫۶۶	۲۲٫۴۲	۲۲٫۴۷	۲۷٫۳۶	۲۷٫۰۶
M (kJ/mol)(mM) ⁻¹	۱۶۱٫۰۴	۱۲۱٫۰۸	۱۱۵٫۸۰	۹۹٫۸۴	۱۰۹٫۳۶	۸۸٫۳۰	۹۴٫۴۵	۸۵٫۳۸
$\Delta H_{Conformation}^\circ$ (kJ/mol)	۳۷٫۴۲		۳۶٫۸۰		۳۷٫۰۲		۳۵٫۴۲	
$\Delta S_{(H_2O)}^\circ$ (kJ/mol.K)	۰٫۰۵	۰٫۰۶	۰٫۰۲	۰٫۰۲	۰٫۰۵	۰٫۰۵	۰٫۰۳	۰٫۰۳
g	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
n	۳٫۰۳	۱٫۱۷	۲٫۹۶	۱٫۵۱	۲٫۶۲	۱٫۳۰	۵٫۶۷	۳٫۵۹
K_{app} (mmol/L) ⁻¹	۴۶٫۷۴	۲۸٫۲۱	۱۲٫۷۱	۱۱٫۷۹	۱۶٫۴۳	۱۳٫۷۵	۲۱٫۵۲	۱۸٫۳۸
وضعیت تعاون در پیوند	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت





شکل ۳- منحنی تغییرهای جذب DNA (Abs) در برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) (a) و هر یک از مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای ۲۷ (●) و ۳۷ (○) درجه سلسیوس.

شکل ۴- منحنی ΔG° در برابر غلظت کمپلکس Pd(II) (a) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای ۲۷ (●) و ۳۷ (○) درجه سلسیوس.

در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس برای هر نقطه از منحنی غیر طبیعی شدن DNA محاسبه شد. سپس منحنی ΔG° ها در برابر غلظت‌ها در ناحیه انتقال برای کمپلکس Pd(II) (a) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II)

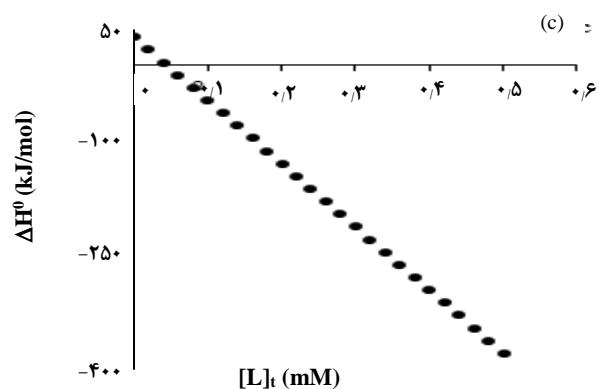
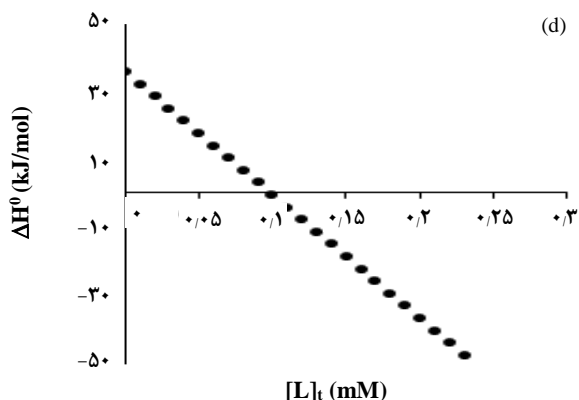
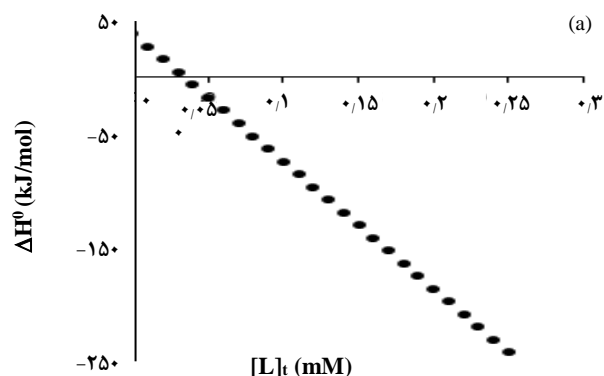
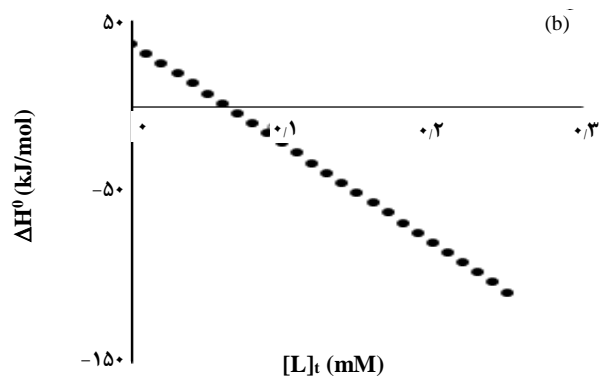
در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس رسم شدند (شکل ۴). معادله خط این منحنی‌ها به صورت $\Delta G^\circ_{(H_2O)} = -m[L]_t$ است، که در آن m شیب منحنی‌ها (قدرت کمپلکس جهت غیرطبیعی کردن

مقدارهای آن افزایش می‌یابد. این افزایش نشان می‌دهد که برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) با DNA در حضور غلظت‌های متفاوت کمپلکس Zn(II) کاهش می‌یابد. این مشاهده‌ها با نتیجه‌های مطالعه‌های سیتوتوکسیسیتی مطابقت کامل دارند.

با استفاده از منحنی‌های غیرطبیعی کردن DNA (شکل ۳) و روش بیس^(۱) [۳۲، ۳۳] K (ثابت برهم‌کنش بین DNA و کمپلکس در فرایند غیر طبیعی شدن) قابل محاسبه است. به دنبال آن ΔG° (تغییرهای انرژی آزاد گیبس) از رابطه $\Delta G^\circ = -RT \ln K$

مقدارهای m (جدول ۲) برای Pd(II) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) نشان می‌دهند که: الف) با افزایش m در هر یک از سامانه‌های چهارگانه مقدارهای m کاهش یافته است. این کاهش نشان دهنده کاهش

(DNA)، و $\Delta G_{(H_2O)}^\circ$ ، عرض از مبدأ این منحنی‌ها است. مقدارهای $\Delta G_{(H_2O)}^\circ$ برای Pd(II) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) (جدول ۲)، تغییرهای زیادی نشان نداد که قابل انتظار است. زیرا $\Delta G_{(H_2O)}^\circ$ نشان دهنده پایداری DNA در عدم حضور کمپلکس است.



شکل ۵ - منحنی ΔH° در مقابل غلظت کمپلکس Pd(II) (a) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در محدوده دمایی ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس.

استفاده شد [۳۴]. سپس نمودار ΔH° در مقابل غلظت کمپلکس Pd(II) (a) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در بازه‌ی دمایی ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس رسم شد (شکل ۵). با برون‌یابی منحنی‌ها (محل تقاطع منحنی با محور y) مقدارهای $\Delta S_{(H_2O)}^\circ$ برای سامانه‌های چهارگانه به‌دست آمد

قدرت غیرطبیعی کنندگی کمپلکس‌ها در دمای بالاتر است. (ب) با افزایش غلظت کمپلکس Zn(II)، قدرت غیرطبیعی کنندگی کمپلکس Pd(II) کاهش می‌یابد. این مشاهده‌ها با نتیجه‌های مطالعه‌های سیتوتوکسی و $[L]_{1/2}$ مطابقت کامل دارند.

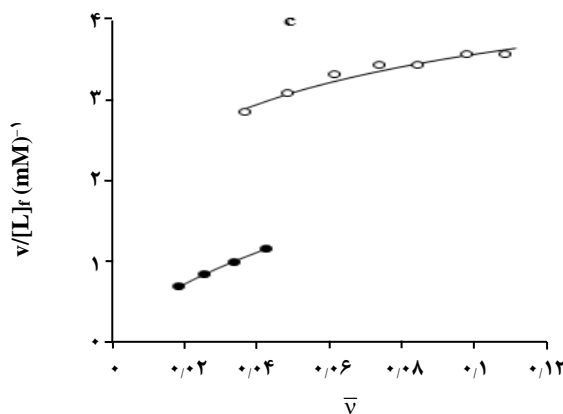
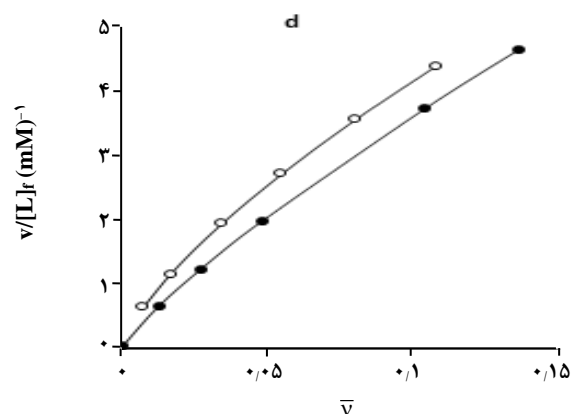
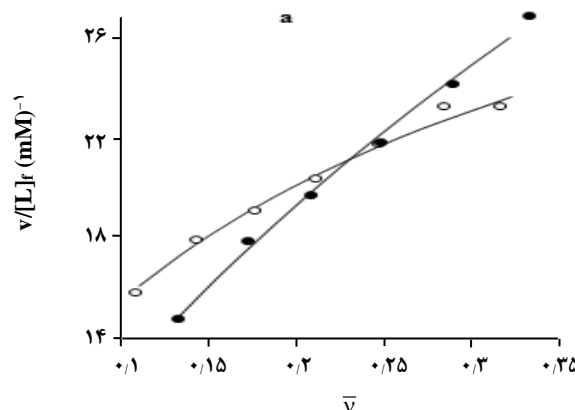
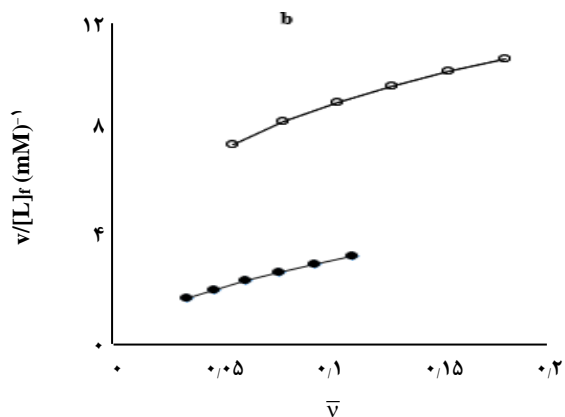
پارامتر ترمودینامیکی مهم دیگر که در فرایند غیرطبیعی کردن DNA می‌توان به‌دست آورد، ΔH° (انرژی لازم جهت غیرطبیعی کردن DNA) است. برای محاسبه این مقدار از رابطه گیبس-هلمهولتز^(۱)

محسوسی نداشت و قابل انتظار بود، زیرا $\Delta S_{(H_2O)}^\circ$ تغییرهای بی‌نظمی DNA در عدم حضور کمپلکس می‌باشد. شایان توجه است که مقادیرهای $\Delta G_{(H_2O)}^\circ$ ، $\Delta H_{(H_2O)}^\circ$ و $\Delta S_{(H_2O)}^\circ$ در شرایط آزمایش (در دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس،

(۱) Gibbs-Helmholtz

(جدول ۴). این مقادیر نیز در سامانه‌ها تغییر محسوسی نداشت که قابل انتظار است زیرا این مقادیر مربوط به آنتالپی مولی فرایند دناتور شدن در عدم حضور کمپلکس است.

تغییرهای آنتروپی غیرطبیعی شدن DNA (میزان بی‌نظمی سامانه) به کمک رابطه $\Delta S_{(H_2O)}^\circ = \Delta H_{(H_2O)}^\circ - \Delta G_{(H_2O)}^\circ / T$ محاسبه شد (جدول ۴). این مقادیر برای کمپلکس Pd(II) و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) تغییر



شکل ۶ - منحنی اسکچارد تجربی (نقطه‌ها) و نظری (خط‌ها) در برهم‌کنش با DNA، برای کمپلکس Pd(II) (a) و هر یک از مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در دمای ۲۷°C و ۳۷°C درجه سلسیوس.

منحنی‌های اسکچارد تجربی و نظری، برای کمپلکس Pd(II) (a) و هر یک از مخلوط نسبت‌های استوکیومتری ۱:۱ (b)، ۲:۱ (c) و ۳:۱ (d) با کمپلکس Zn(II) در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس رسم شد (شکل ۶). این منحنی‌ها نشان می‌دهند که: الف) یافته‌های به دست آمده از مطالعه‌های تجربی (نقطه‌ها) و

حلال آب و pH ثابت) تغییرهای محسوسی ندارند. این بدان معنی است که عامل اصلی تغییرها در DNA (مثلا غیر طبیعی شدن) حضور کمپلکس‌ها می‌باشد.

تیتراسیون DNA توسط کمپلکس‌ها و رسم نمودار اسکچارد

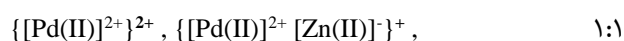
استوکیومتری ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ با کمپلکس Zn(II) نیز محاسبه شد (جدول ۴) [۲۱]:

(۱) K_{app} (ثابت ظاهری برهم‌کنش کمپلکس با DNA):
الف) با افزایش دما در هر یک از سامانه‌های چهارگانه، کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش سرعت برهم‌کنش با افزایش دماست. بنابراین شاید برهم‌کنش این کمپلکس‌ها با DNA گرم‌از است.
ب) مقدارهای K_{app} با افزایش کمپلکس Zn(II) در هر دو دمای

(۱) Cooperative

نتیجه گیری

در این پژوهش‌ها کمپلکس ضدتومور به فرمول $[Pd(bpy)_2]^{2+}$ $(NO_3^-)_2$ با دو بار مثبت و کمپلکس جدید $K^+ [Zn(Gly)_3]^-$ با یک بار منفی تهیه و ساختار آن‌ها با روش‌های طیف‌سنجی و غیر طیف‌سنجی شناسایی شد. این دو ترکیب را به ترتیب با Pd(II) و Zn(II) نشان داده و مخلوط نسبت‌های استوکیومتری زیر را از آن‌ها تهیه نمودیم:



بدین ترتیب در این چهار سامانه بار مثبت از نسبت ۱:۱ به ۱:۳ کاهش می‌یابد. یافته‌های این پژوهش‌ها نشان داد که هرچه تراکم بار مثبت بر روی کمپلکس بیش‌تر باشد ویژگی‌های ضدتومور و تمایل برهم‌کنش آن با DNA بیش‌تر است. دلیل آن را به این صورت می‌توان دانست که با افزایش نسبت غلظت $[Zn(II)]^{-}$ ، تجمع بار روی مجموعه افزایش یافته و این تراکم بار منفی با بار منفی روی گروه‌های فسفات سطح DNA دافعه اکترواستاتیکی داشته و اثربخشی کم می‌شود.

قدردانی

نویسندگان از دانشگاه سیستان و بلوچستان بابت در اختیار قرار دادن امکانات برای انجام پژوهش‌ها تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶

نظری (خطها) تطابق زیاد داشته و یکدیگر را تأیید می‌کنند و ب) برهم‌کنش سامانه‌های چهارگانه با DNA به صورت متعاون^(۱)

انجام می‌شود. یعنی اتصال یک مولکول از کمپلکس به یک جایگاه DNA، باعث سادگی در اتصال مولکول دوم به جایگاه‌های مجاور می‌شود. این مشاهده یکی از نتیجه‌های جالب این مطالعه‌ها است.

در این آزمایش پارامترهای پیوندی g ، K_{app} و n که مقدارها نظری بودند، برای کمپلکس Pd(II) و مخلوط نسبت‌های ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس، کاهش می‌یابد. این مشاهده‌ها نشان می‌دهد که افزایش کمپلکس Zn(II) به کمپلکس Pd(II) باعث کاهش سرعت برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) با DNA می‌شود. ج) در بین نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ از کمپلکس Pd(II) با Zn(II)، ثابت سرعت افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد که هرچند کمپلکس Zn(II) باعث کاهش سرعت برهم‌کنش کمپلکس Pd(II) می‌شود، اما خودش با DNA برهم‌کنش دارد. زیرا با افزایش کمپلکس Zn(II) در سه سامانه ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ سرعت افزایش می‌یابد.

(۲) g (تعداد جایگاه‌های پیوندی موجود در DNA برای سامانه‌های چهارگانه به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید): در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس برابر با ۲ است. ثابت بودن تعداد جایگاه‌ها شاید نشانه این است که در سامانه‌های چهارگانه فقط کمپلکس Pd(II) است که به علت مسطح بودن در DNA اینترکیلیت می‌شود ولی در هر یک از جایگاه‌هایی که اینترکیلیشن انجام می‌شود، تغییرهای صورت‌بندی به گونه‌ای است که برهم‌کنش کمپلکس Zn(II) با DNA را نیز مسیر می‌سازد.

(۳) n (ضریب هیل): برای کلیه سامانه‌های چهارگانه در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس بزرگ‌تر از واحد است که نشان دهنده تعاونی مثبت سامانه‌ها است. یعنی یک اتصال، اتصال‌های بعدی به DNA را تسهیل می‌کند. این مشاهده‌ها، منحنی اسکچارد تجربی را تأیید می‌نماید. زیرا منحنی‌های اسکچارد نیز از نوع گودی رو به بالا بود که با تعاونی مثبت سامانه‌ها منطبق‌اند.

مراجع

- [1] Miller E.C., Miller J.A., *Mechanisms of Chemical Carcinogenesis, Cancer*, 47(S5): 1055-1064 (1981).

- [2] Aminzadeh A., **FT- SERS Study of Adriamycin - DNA Interaction**, *Iran. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **22**(1): 9-11 (2003).
- [3] HeidaryAlizadeh B., Vosooghi M., Khoobi M., Javidnia A., Panah F., Safavi M., Ardestani S., Shafiee A., **Synthesis and Cytotoxic Activity of Novel 9-[Hydroxy(Substitutedphenyl) Methyl]-2,2-Dimethyl-2,3,8,9-Tetrahydro-4H,10H-Pyrano [2,3-f]Chromene-4,10-Diones**, *Iran. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **29**(4): 189-196 (2010).
- [4] Xinming W., Dongling X.U., **Studies on the Binding of DNA with the Inclusion of Brilliant Green Inside the Cavity of γ -Cyclodextrin**, *Iran. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **32**(2): 1-7 (2013).
- [5] اسماعیل‌زایی، زهره؛ صبوری، علی‌اکبر؛ منصوری‌ترشیزی، حسن؛ سعیدی‌فر، مریم؛ دیوسالار، عادل، **مطالعه برهم‌کنش کمپلکس‌های نیکل (II) دارای لیگاندهای آروماتیک مسطح با DNA غده تیموس**، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲)۳۲: ۱ تا ۱۳ (۱۳۹۲).
- [6] Dhara K., Ratha J., Manassero M., Wang X.Y., Gao S., Baneree P., **Synthesis, Crystal Structure, Magnetic Property and Oxidative DNA Cleavage Activity of an Octanuclear Copper(II) Complex Showing Water-Perchlorate Helical Network**, *Inorg. Biochem*, **101**(1): 95-103 (2006).
- [7] firdaus F., Fatma K., Azam M., Khan S.N., Khan A.U., Shakir M., **Template Synthesis and Physicochemical Studies of 14-Membered Hexaazamacrocyclic Complexes with Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II): A Comparative Spectroscopic Approach on DNA Binding with Cu(II) and Ni(II) Complexes**, *Transition. Met. Chem*, **33**(4): 467-473 (2008).
- [8] Bruijninx P.C.A and Sadler P.J., **Controlling Platinum, Ruthenium and Osmium reactivity for Anticancer Drug Design**, *Adv. Inorg. Chem*, **61**: 1-62 (2009).
- [9] Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H., **Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents**, *Nature*, **222**(5191): 385-6 (1969).
- [10] Florea A.M., Büsselberg D., **Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects**, *Cancers*, **3**(1): 1351-1371 (2011).
- [11] AbuSurrah A.S., AlAllaf T., Rshan L., Klinga M., Leskelä M., **Synthesis. Crystal Structure and Initial Biological Evaluation of the New Enantiomerically Pure Chiral Palladium(II) Complex *trans*-bis{endo-(1R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]-heptan-2-amino} palladium(II) dichloride**, *Eur. J Med. Chem*, **37**(11): 919-922 (2002).
- [12] AbuSurrah A.S., Kettunen M., Lappalainen K., Piironen U., Klinga M., Leskelä M., **Synthesis of New Chiral Palladium(II) and Nickel(II) Complexes Bearing Oxazoline- and Myrtanyl-Based Nitrogen Ligands. Crystal Structure of the C2-Symmetric Complex [(1R,2S)-Indabox]PdCl₂] Polyhedron**, *Polyhedron*, **21**(5): 27-31 (2002).
- [13] Talal A.K., AlAllaf Luay J., Rshan., **Synthesis and Cytotoxic Evaluation of the First *trans*-Palladium(II) Complex with Naturally Occurring Alkaloid Harmine**, *Eur. J. Med. Chem*, **33**(19): 817-820 (1998).

- [14] Caires A.C.F., [Recent Advances Involving Palladium\(II\) Complexes for the Cancer Therapy](#), *Anti-Cancer. Agents. Med. Chem*, **7**(5): 484-494 (2007).
- [15] Pinedo H.M., Schornagel J.H., ["Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy 2"](#), Plenum Press, New York (1996).
- [16] Khalvat A., Rostamian A., Najafizadeh S.R., Meisami A.P., [The Comparison between Monotherapy and Combination Therapy in Rheumatoid Arthritis](#), *Tehran. University. Medical. Journal. (TUMJ)*, **64**(11): 69-76 (2007).
- [17] Hinamoto M., Ooi S., Kuroya H., [Crystal Structure of Bis-\(2,2'-bipyridyl\)palladium\(II\) Nitrate Monohydrate and the Stereochemistry of Palladium\(II\)](#), *Chem. Soc.*, **6**: 356-357 (1972).
- [18] Palocsay A., Rund J.V., [Reaction between 1,10 Phenanthroline and Platinum\(II\) Compounds: Reaction in Aqueous Solution](#), *Inorg. Chem*, **8**(3): 524-28 (1969).
- [19] Sorinezami Z., MansouriTorshizi H, Shahraki S, Ghahghaei A, Doostkami M, Divsalar A, Saboury A.A, HeidariMajd M., [Synthesis, Cytotoxicity and DNA Binding of Novel Binuclear Antitumor Complexes Formed by Linking Two "2,2'- Bipyridine Palladium \(II\)" Moieties via Alkylene Bisdithiocarbamates](#), *Asian. Journal. Pharmaceutical. Technology. Innovation. (AJPTI)*, **2**(7): 105-122 (2014).
- [20] Scatchard G., [The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions](#), *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **51**(4): 660-72 (1949).
- [21] Hill A.V., [The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Haemoglobin its Dissociation Curves](#), *J. Physiol*, 40:4-7 (1910).
- [22] James M.L., Smith G.M., Wolford J.C., ["Applied Numerical Methods for Digital Computer"](#), Harpercollins College Div, New York (1985).
- [23] T Olufunmilayo-Aiyelabola., O Isaac., A Olugbenga., [Structural and Antimicrobial Studies of Coordination Compounds of Phenylalanine and Glycine](#), *Int. J. Chem*, **4**(2): 49-59 (2012).
- [24] Angelici R.J." [Synthesis and Technique in Inorganic Chemistry](#)", Saunders, Philadelphia (1991).
- [25] Rafael A.A., Shourong Z., Kevin K.K., Judith A.W., [Synthesis and X-Ray Crystal Structure Determination of Monomeric cis-Pd\(2,2'-bipyridine\)\(NO₃\)₂](#), *Inorg. Chem. Commun*, **10**(12): 1527-1530 (2007).
- [26] D Goebbert., E Garand., T Wende., R Bergmann., Meijer G., Asmis K., Neumark D., [Infrared Spectroscopy of the Microhydrated Nitrate Ions NO₃-\(H₂O\)₁₋₆](#), *Phys. Chem. A*, **113**(26): 7584-7592 (2009).
- [27] Raman N., Jeyamurugan R., Sudharsan S., Karuppasamy K., Mitu L., [Metal Based Pharmacologically Active Agents: Synthesis, Structural Elucidation, DNA Interaction, in vitro Antimicrobial and in Vitro Cytotoxic Screening of Copper\(II\) and Zinc\(II\) Complexes Derived from Amino Acid Based Pyrazolone Derivatives](#), *Arab. J. Chem*, **6**(2): 235-247 (2013).
- [28] Wolpert M., Hellwig P., [Infrared Spectra and Molar Absorption Coefficients of the 20 Alpha Amino Acids in Aqueous Solutions in the Spectral Range from 1800 to 500 cm⁻¹](#), *Spectrochim.*

- Acta Mol*, **64**(4): 987–1001 (2006).
- [29] Juribašić M., Ćurić M., Molčanov K., Matković-Čalogović D., D Babić., [Unusual Zzobenzene/Bipyridine Palladacycles: Structural, Dynamical, Photophysical and Theoretical Studies](#), *Dalton. Trans*, **39**(37): 8769–8778 (2010).
- [30] Sahoo H.S., Chand D.K., Mahalakshmi S., Mir M.H., Raghunathan R., [Manifestation of Diamagnetic Chemical Shifts of Proton NMR Signals by an Anisotropic Shielding Effect of Nitrate Anions](#), *Tetrahedron. Lett*, **48**(5): 761–765 (2007).
- [31] Wishart D.S., Bigam C.G., Holm A., Robert S. DSykes H.B., [¹H, ¹³C and ¹⁵N Random Coil NMR Chemical Shifts of the Common Aminoacids](#), *J. Biomol. NMR*, **5**(1): 67-81 (1995).
- [32] Greene R.F., Pace C.N., [Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease, Lysozyme, α-Chymotrypsin, and β-Lactoglobulin](#), *Biol. Chem*, **249**(17): 5388-5393 (1974).
- [33] MansouriTorshizi H., IslamiMoghaddam M., Saboury A.A., [A Microcalorimetry and Spectroscopy Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with 2,2'-Bipyridine Octylglycinato Palladium \(II\) Nitrate](#), *Acta Bioch. Bioph. Sin. (ABBS)*, **35**(10): 886-890 (2003).
- [34] Barrow G.M., “Physical Chemistry”. McGraw-Hill, New York (1988)