

بررسی برهم کنش کمپلکس‌های ضد تومور پالادیوم و پلاتین دارای اتیل دی تیوکر بامات با سرم آلبومین انسانی

محبوبه اسلامی مقدم*⁺

پژوهشکده توسعه فرایندهای شیمیایی، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

حسن منصوری ترشیزی

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

مریم سعیدی فر

پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

چکیده: در این پروژه دو کمپلکس پلاتین و پالادیوم از مشتق اتیل دی تیوکر بامات با فرمول کلی $[Pt(bpy)(Et-dtc)]NO_3$ و $[Pd(bpy)(Et-dtc)]NO_3$ با ویژگی‌های ضد سرطانی علیه سلول‌های سرطان خون انسانی K562 در نظر گرفته شدند. این ترکیب‌ها مقادارهای $Cc50$ کم‌تر از سیس پلاتین داشته و به ترتیب برای ترکیب‌های پالادیوم و پلاتین ۵۵ و ۸۹ میکرومولار می‌باشند. برهم کنش این ترکیب‌ها با سرم آلبومین انسانی (HSA) در محیط تریس بافر حاوی ۱۰ میلی مولار سدیم کلرید با $pH=7.4$ در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس به کمک روش‌های گوناگون طیف سنجی مطالعه شد. نتیجه‌های به دست آمده از مطالعه‌های غیرطبیعی کردن پروتئین در حضور کمپلکس‌ها نشان دهنده این است که کمپلکس پالادیوم احتمال دارد ساختار پروتئین را به هم ریخته و باعث عوارض جانبی شود درحالی که کمپلکس پلاتین این گونه نیست. نتیجه‌های تیتراژ کردن هم‌دما نشان داد با افزایش غلظت کمپلکس، پایداری پروتئین کاهش یافته و فرایند غیرطبیعی شدن سرم آلبومین در حضور این کمپلکس‌ها گرمازا می‌باشد و اتصال کمپلکس کاتیونی و پروتئین را می‌توان از نوع برهم کنش‌های الکتروستاتیک در نظر گرفت. این کمپلکس‌ها به‌ویژه ترکیب پلاتین می‌توانند پروتئین را در غلظت‌های میکرومولار غیرطبیعی کنند. روند تغییرها شدت فلوروسانس HSA در حضور غلظت‌های متفاوت از هر یک از کمپلکس‌های فازی پالادیوم و پلاتین نشان داد که این کمپلکس‌ها می‌توانند شدت نشر فلوروسانس کاهش دهند و به پروتئین متصل می‌شوند و خاموشی استاتیک رخ می‌دهد. تغییر ساختار پروتئین با افزایش غلظت‌های متفاوتی از کمپلکس‌های پلاتین و پالادیوم با طیف‌گیری CD بررسی شد و مشخص شد درصد مارپیچ آلفا و صفحه‌های بتا در ساختار دوم به ترتیب ۳ و ۵ درصد کاهش می‌یابد که بیانگر این است که ساختمان غالب HSA در سامانه، مارپیچ آلفا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس‌های پلاتین (II) و پالادیوم (II)؛ برهم کنش با HSA؛ اتیل دی تیوکر بامات؛ سرم آلبومین انسانی؛ پارامترهای پیوندی؛ پارامترهای ترمودینامیکی.

KEYWORDS: Pt(II) and Pd(II) complexes; HSA interaction; Ethyldithiocarbamate; Human albumin serum; Binding parameters; Thermodynamic parameters.

+E-mail: moghadam@ccerci.ac.ir

*عهده دار مکاتبات

مقدمه

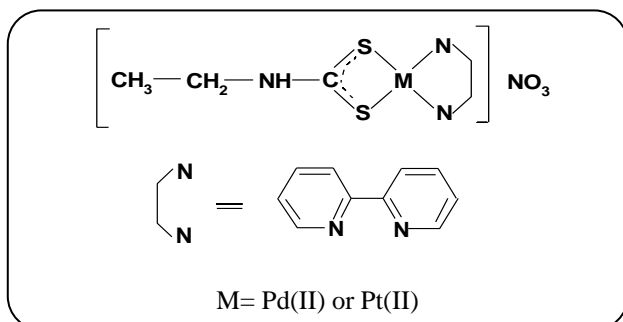
سرطان، به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان، بیماری است که در آن سلول‌ها به طور غیرعادی رشد و گسترش می‌یابند و اگر رشد این سلول‌ها کنترل نشود، منجر به مرگ بیمار می‌شوند [۱، ۲]. متأسفانه به دلیل سمیت داروهای ضد سرطان و انتخاب‌گری آن‌ها بر علیه رشد سریع سلول‌ها، بافت‌های سالم نیز در معرض خطر بوده و عوارض ناخوشایندی از جمله حالت تهوع، ریزش مو، کم خونی و مسمومیت گوارشی را به دنبال دارد. طراحی ترکیب‌های جدید ضدسرطان می‌تواند به ساخت داروهایی با عوارض جانبی کم‌تر منتهی شود. استفاده گسترده از داروهایی ضدسرطان بر پایه فلز با کشف فعالیت سیس پلاتین برای درمان سرطان سر و گردن، بیضه، تخمدان، مثانه و ریه آغاز شد [۳]. با وجود موفقیت بالینی سیس پلاتین، استفاده از این دارو موجب اثرات جانبی شدید مانند نارسایی کلیوی و عصبی، آسیب شنوایی و تهوع می‌شود. همچنین این دارو نسبت به برخی غده‌ها مانند سرطان سینه، و روده بزرگ (کلون) ناکارآمد است و نیز برخی غده‌های سرطانی نسبت به این دارو مقاوم می‌باشند [۴].

به علت عوارض جانبی دیده شده در ترکیب‌های ضدسرطان برپایه پلاتین، تلاش‌ها برای سنتز کمپلکس‌هایی با عوارض جانبی کم‌تر و سمیت کمینه در برابر سلول‌های سرطانی ادامه دارد. مطالعه‌ها نشان می‌دهد با تغییر چربی‌دوستی و نفوذپذیری کمپلکس اثر ضد سرطانی آن‌ها تغییر می‌کند [۵]. روش دیگر، برای کاهش عوارض جانبی تغییر فلز مرکزی پلاتین در طراحی داروی جدید است. فلز پالادیوم بهترین گزینه برای این تغییر به حساب می‌آید زیرا شیمی کوردیناسیون پلاتین و پالادیوم شباهت زیادی به یکدیگر دارند. در این دسته ترکیب‌ها به علت کاهش تمایل پیوند پالادیوم با گروه‌های گوگردار زیست مولکول‌ها، عوارض جانبی مانند مسمومیت کلیوی در مقایسه با کمپلکس‌های پلاتین کاهش می‌یابد [۶]. مطالعه‌ها نشان می‌دهد لیگاند‌هایی که اتم دهنده آن‌ها گوگرد است مانند سیستین، پنی سیل آمین، متیونین، تیو اوره، تیو سولفات و دی اتیل دی تیو کربامات می‌توانند سمیت کلیوی سیس پلاتین را تا حد زیادی کاهش دهند [۷]. البته زمان تزریق این ترکیب‌ها در شیمی درمانی از اهمیت خاصی برخوردار است. به عنوان نمونه، مؤثرترین زمان برای استفاده از اتیل دی تیو کربامات چهار ساعت پس از تزریق سیس پلاتین می‌باشد. در این فرایند، علت کاهش سمیت کلیوی این است که اتیل دی تیو کربامات پیوند سیس پلاتین با گروه -SH از سیستین موجود در پروتئین‌های

جدار نفرون‌های کلیه را برگشت داده و خود جایگزین شده به طوری که ترکیب به دست آمده در آب محلول بوده و به راحتی از طریق ادرار دفع می‌شود. پژوهش‌های بعدی نشان دادند که خوشبختانه اتیل دی تیو کربامات تأثیری بر پیوند تشکیل شده بین سیس پلاتین و DNA در سلول سرطانی ندارد. به این ترتیب پیشنهاد شد به جای استفاده از اتیل دی تیو کربامات همراه با سیس پلاتین، شاید بتوان از کمپلکس‌های اتیل دی تیو کربامات با پلاتین استفاده نمود [۸].

از سویی انتقال دارو در بدن توسط مولکول‌های پروتئین آلبومین سرم خون صورت می‌گیرد. پیوند دارو با آلبومین خون و تغییر ساختار پروتئین، یکی از عامل‌های بروز عوارض جانبی دارو می‌باشد. از این رو، بر هم‌کنش داروهای متفاوتی با این پروتئین مطالعه شده است [۹-۱۱]. آلبومین دارای نقش‌های زیستی مهمی در بدن می‌باشد و یک پروتئین چند عملکردی است. از نظر ساختاری بسیار انعطاف پذیر است ولی به سادگی غیرطبیعی نمی‌شود. این پروتئین حامل بسیاری از ترکیب‌های گوناگون از جمله بیلی روبین، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، هورمون‌ها، داروها، آنتی بیوتیک‌ها، ترکیب‌های حلقوی باردار و کوچک و بسیاری از کاتیون‌های فلزی می‌باشد [۱۲]. در فرایند غیرطبیعی شدن پروتئین ساختمان اولیه (توالی اسیدهای آمینه) ماکرومولکول تغییر نمی‌کند، بلکه آرایش فضایی آن که شامل آرایش خاص اتم‌ها در فضای سه بعدی، طول پیوندها و زاویه‌های پیوندی می‌باشد، تغییر می‌کند. به عبارت دیگر، رشته‌های پروتئین‌ها در اثر تا خوردن، آرایش فضایی خاصی می‌گیرند که تنها در آن ساختار می‌توانند در سامانه فیزیولوژی نقش بازی کنند. بنابراین بین ساختار و نقش پروتئین باید رابطه‌ای وجود داشته باشد. این رابطه با غیرطبیعی کردن پروتئین شناخته‌تر می‌شود. مطالعه غیرطبیعی شدن پروتئین با طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش و فلورسانس و نیز بررسی تغییر ساختار پروتئین با طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی صورت می‌پذیرد [۱۳].

در این کار پژوهشی، دو کمپلکس محلول در آب با فلزهای پلاتین و پالادیوم با لیگاند‌های کی‌لیت ۲ و ۲- بی پیریدین و اتیل دی تیو کربامات، که دارای ویژگی‌های ضدتومور علیه سلول‌های سرطان خون انسانی K₅₆₂ می‌باشند [۱۴]، در نظر گرفته شدند و برهم‌کنش این کمپلکس‌ها با پروتئین سرم آلبومین انسانی، HSA، به روش تیتراسیون همدمای در تریس بافر دارای سدیم کلرید (۱۰ میلی مولار) و pH=۷٫۴ در دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلیسیوس



شکل ۱- ساختار پیشنهادی برای کمپلکس‌های پلاتین و پالادیوم با لیگاند اتیل دی تیوکربامات.

ثبت شد. افزایش محلول کمپلکس با حجم یاد شده آن قدر تکرار شد تا اختلاف جذب‌ها یکسان شد. این آزمایش در دماهای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. سرانجام منحنی جذب‌ها در دو دما در مقابل غلظت‌ها به صورت جداگانه برای هر ترکیب رسم شد [۱۵].

منحنی غیر طبیعی شدن HSA، A، اختلاف جذب کمپلکس- HSA با HSA در طول موج ۲۸۰ نانومتر در برابر غلظت کل کمپلکس $[L]_t$ ، یک منحنی سیگموئیدی شامل سه ناحیه پیش انتقال (فرم طبیعی HSA)، ناحیه انتقال (تغییرهای ناگهانی جذب، همراه با غیرطبیعی شدن HSA) و ناحیه پس انتقال (غیرطبیعی شدن کامل HSA) است که می‌تواند سیر کاهشی یا افزایشی داشته باشد. این رفتار به نحوه برهم‌کنش HSA با کمپلکس بستگی دارد. به کمک این منحنی‌ها و به روش Pace می‌توان پارامترهای ترمودینامیکی این فرایند را به دست آورد [۱۶، ۱۴]. برای سامانه تعادلی موردنظر، که در دو حالت فرم طبیعی (N) و فرم غیرطبیعی (D) در نظر گرفته می‌شود، K، ثابت تعادل واکنش غیرطبیعی شدن است.

برای تعیین K باید A_D (جذب‌های محلول HSA غیر طبیعی)، A_N (جذب‌های محلول HSA طبیعی) و A_{obs} (تغییرهای شدید جذب‌ها در ناحیه انتقال از منحنی سیگموئیدی) به دست آید. با عبور بهترین خط راست از ناحیه‌های پس انتقال، A_D ، پیش انتقال، A_N و از ناحیه انتقال، A_{obs} و تعیین معادله خط برای هر یک از آن‌ها، می‌توان A_N و A_D و A_{obs} برای هر مقدار دلخواهی از $[L]_t$ را در بازه‌ی تغییرهای شدید منحنی در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس به دست آورد. همچنین مقدار K از رابطه $K = (A_N - A_{obs}) / (A_{obs} - A_D)$ به ازای هر غلظت خاصی از کمپلکس قابل محاسبه است. با استفاده از معادله‌های $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ و $\Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{H_2O} - m[\text{complex}]$ ، ثابت تشکیل، K و تغییرهای انرژی گیبس، ΔG° ، محاسبه می‌شود که در آن

مطالعه شد. شیوه‌های پیوندی این کمپلکس‌ها با پروتئین سرم آلبومین به کمک طیف سنجی مرئی فرابنفش، فلوروسانس و دورنگ نمایی دورانی بررسی شد. در بررسی برهم‌کنش کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین با HSA، پارامترهای پیوندی و پارامترهای ترمودینامیکی تعیین شدند.

بخش تجربی

مواد و تجهیزات

حلال‌های مورد استفاده پیش از مصرف، توسط روش‌های استاندارد تقطیر شدند. واکنشگرهای نقره نترات، ۲،۲-بی‌پیریدین، سدیم کلرید و سرم آلبومین انسانی و تریس هیدروکسی متیل آمینو متان از شرکت آلد ریچ خریداری شد. کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین (شکل ۱) نیز به روش گزارش شده تهیه شدند [۱۴].

طیف‌های الکترونی در ناحیه مرئی و فرابنفش، با استفاده از دستگاه UV-Vis Spectrophotometer JENWAY6400 ساخت انگلستان ثبت شد. همچنین، pH محلول‌ها توسط دستگاه pH متر Ω Metrohm مدل ۸۲۶ اندازه‌گیری شد. ترازوی دیجیتال And ژاپن چهار رقم اعشار برای توزین مواد استفاده شد. اندازه‌گیری‌های شدت فلوروسانس با اسپکترومتر FP-6500، JASCO انجام شد. طیف‌های CD توسط دستگاه اسپکتروپلاریمتر Aviv مدل ۲۱۵ ثبت شد.

روش‌های مطالعه برهم‌کنش کمپلکس‌های فلزی با HSA

مطالعه غیر طبیعی شدن HSA در حضور کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین به کمک طیف سنجی جذبی

برهم‌کنش دو ترکیب پالادیوم و پلاتین با HSA در محیط تریس بافر حاوی ۱۰ میلی مولار سدیم کلرید با $pH = 7.4$ در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس با زمان انکوباسیون ۳۰ دقیقه به کمک طیف سنجی مرئی - فرابنفش مطالعه شد. محلول‌های مادر کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین با غلظت ۱ میلی مولار و محلول مادر HSA با غلظت ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط بافر تهیه شدند. در این آزمایش، نخست جذب ۱/۸ میلی لیتر محلول پروتئین با غلظت ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر ثبت شد و سپس با حجم معینی (۵۰ میکرولیتر) از محلول مادر کمپلکس با غلظت ۱ میلی مولار تیترا شد و تغییرهای جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (برای HSA) و ۶۴۰ نانومتر (برای تعیین میزان کدورت احتمالی در محتویات سل)

انکوبه شد و تغییرها ساختار HSA در حضور کمپلکس بررسی شد. همچنین طیف‌های بافر تنها و کمپلکس بدون پروتئین نیز به عنوان نمونه‌های شاهد ثبت شدند.

نتیجه‌ها و بحث

غیر طبیعی شدن HSA

طی آزمایش غیرطبیعی شدن HSA در حضور هر یک از کمپلکس‌ها، اختلاف جذب در طول موج‌های ۲۸۰ و ۶۴۰ نانومتر که در ضریب رقت، ضرب شده با نام A یادداشت شد. منحنی A در برابر غلظت کل کمپلکس ([L]_i) در این دو دما رسم شد. منحنی‌های غیرطبیعی شدن در شکل ۲ نشان داده شده‌اند که برای سامانه پالادیوم سیگموئیدی صعودی و برای سامانه پلاتین سیگموئیدی کاهشی دیده می‌شود. این تفاوت به شیوه متفاوت غیرطبیعی شدن پروتئین توسط کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین قرارگیری کروموفورهای تریپتوفان به ترتیب در سطح و در عمق پروتئین می‌تواند مربوط باشد. به عبارت دیگر در برهم‌کنش کمپلکس پالادیوم، پروتئین غیر طبیعی شده و تریپتوفان‌ها به مقدار بیش‌تر در معرض پرتوهای UV قرار گرفته و جذب افزایش می‌یابد. در حالی که در برهم‌کنش کمپلکس پلاتین تغییر کنفورماسیون HSA به گونه‌ای بوده که تریپتوفان‌ها از معرض نور UV مخفی و در نتیجه جذب نور کاهش و منحنی سیگموئید کاهشی است. این مشاهده جالب را می‌توان به واکنش پذیری بیش‌تر کمپلکس پالادیوم نسبت به کمپلکس پلاتین نسبت داد، زیرا کمپلکس پالادیوم ۱۰۰۰۰۰ مرتبه فعالیت سینتیکی بیش‌تری نسبت به کمپلکس پلاتین دارد [۱۴]. از سویی می‌تواند به تفاوت در ساختار دو ترکیب مربوط باشد. با وجود این‌که شیمی کنوردیناسیون پالادیوم و پلاتین همانند هم می‌باشند اما لیگاند‌های گوگرد دهنده از نظر نرمی و سختی برای فلز مرکزی پلاتین لیگاند مناسب تری می‌باشند و احتمال می‌رود با تغییر ساختار، چگونگی قرارگیری دو ترکیب در سطح پروتئین متفاوت باشد و کمپلکس پلاتین در جایگاه فعال پروتئین وارد شده و جذب پرتوهای UV توسط تریپتوفان‌ها را حایل شده است.

غلظت لیگاند در نقطه میانی انتقال ([L]_{1/2}) مربوط به غیرطبیعی شدن HSA در حضور کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین در جدول ۱ درج شده است. این مقادیر با افزایش دما کاهش می‌یابند، زیرا افزایش دما به فرایند غیرطبیعی شدن پروتئین در حضور کمپلکس کمک می‌کند. اختلاف این پارامتر

R ثابت جهانی گازها می‌باشد. با رسم منحنی ΔG° در برابر [L]_i، نمودار خطی دیده می‌شود که عرض از مبدأ این خط، $\Delta G^\circ_{H_2O}$ نشان دهنده پایداری پروتئین در عدم حضور کمپلکس و شیب خط، m، میزان قدرت غیرطبیعی‌کنندگی کمپلکس است. همچنین می‌توان گرمای لازم برای غیرطبیعی شدن HSA در بازه‌ی دمایی ۲۷ تا ۳۷ درجه سلسیوس را به صورت زیر از معادله (۱) معادله گیبس - هلمهولتز، به دست آورد:

$$\Delta H^\circ = \frac{\frac{\Delta G^\circ(T_1)}{T_1} - \frac{\Delta G^\circ(T_2)}{T_2}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad (1)$$

مطالعه‌های فلوروسانس

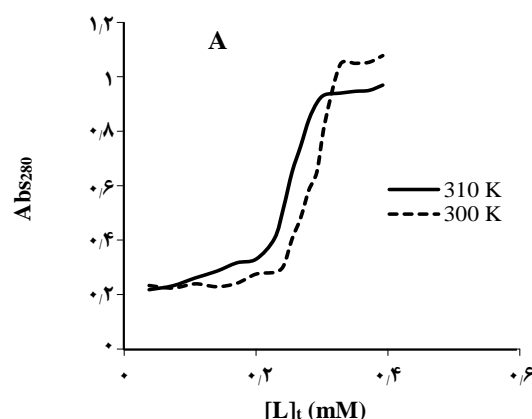
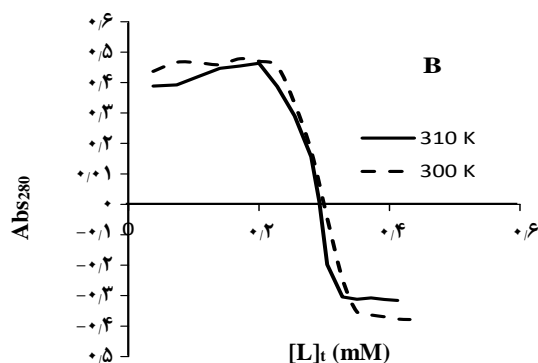
اندازه‌گیری شدت نشر فلوروسانس ذاتی تریپتوفان HSA با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به منظور مطالعه تأثیر کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین با غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار بر ساختار آن، تعداد جایگاه اتصال، تمایل پیوندی و نوع برهم‌کنش بین پروتئین و کمپلکس انجام شد. طیف نشری پروتئین طبیعی (بدون حضور کمپلکس) و پروتئین در حضور غلظت‌های گوناگون کمپلکس پالادیوم و پلاتین در دمای محیط ثبت شد. پیش از هر بار خواندن نشر فلوروسانس، محلول پروتئین به مدت ۳ دقیقه با کمپلکس پالادیوم یا پلاتین انکوبه شد. نشر فلوروسانس بین طول‌موج‌های ۲۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت شد و طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر تنظیم شد. کووت‌های استفاده شده از جنس کوارتز، دارای حجمی معادل ۷۰۰ میکرولیتر و طول مسیر عبوری معادل یک سانتی‌متر بود.

مطالعه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی

طیف‌های دیده شده در ناحیه فرابنفش دور (۱۹۰-۲۶۰ نانومتر) منطبق با جذب پیوندهای پپتیدی است. با این آزمایش تغییر ساختارهای دوم منظم پروتئین در غیاب و در حضور غلظت‌های گوناگون از کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین در دمای محیط بررسی شد. غلظت پروتئین مورد نیاز برای این مطالعه ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و تغییرها در ساختار HSA به دست آمده از برهم‌کنش کمپلکس پس از ۳ دقیقه انکوباسیون بررسی شد. پروتئین با سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار از کمپلکس

جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی غیرطبیعی شدن HSA توسط کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین در دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس.

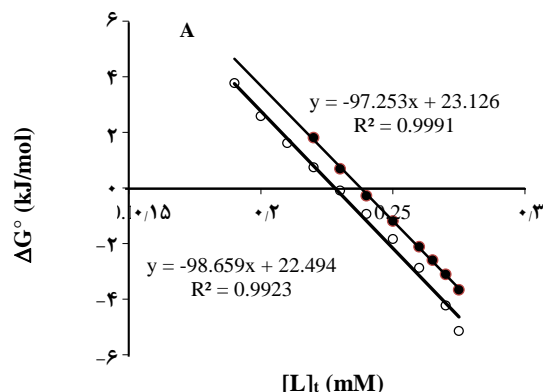
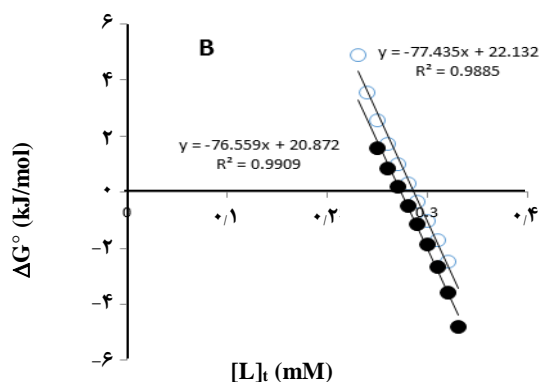
کمپلکس	دما (°C)	$L_{1/2}$ (mmol/L)	m (kJ/mol) (mmol/L) ⁻¹	$\Delta G^0_{(H_2O)}$ (kJ/mol)	$\Delta H^0_{(H_2O)}$ (kJ/mol)	$\Delta S^0_{(H_2O)}$ (kJ/mol.K)
[Pd(bpy)(Et-dtc)]NO ₃	۲۷	۰٫۲۸	۹۷	۲۳٫۱۳	۴۱٫۰۹	۰٫۰۶۲
	۳۷	۰٫۲۴	۹۸	۲۲٫۴۹		۰٫۰۶۲
[Pt(bpy)(Et-dtc)]NO ₃	۲۷	۰٫۲۹	۷۷٫۴۳	۲۲٫۱۳	۵۹٫۷۳	۰٫۱۲۵
	۳۷	۰٫۲۶	۷۶٫۵۶	۲۰٫۸۷		۰٫۱۲۵

شکل ۲- نمودار غیرطبیعی شدن سرم آلبومین در حضور کمپلکس‌های [Pd(bpy)(Et-dtc)]NO₃ (A) و [Pt(bpy)(Et-dtc)]NO₃ (B) در دو دمای ۲۷ و ۳۷°C در محیط بافر تریس.

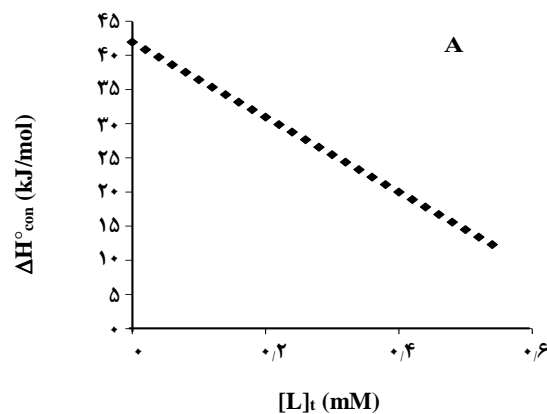
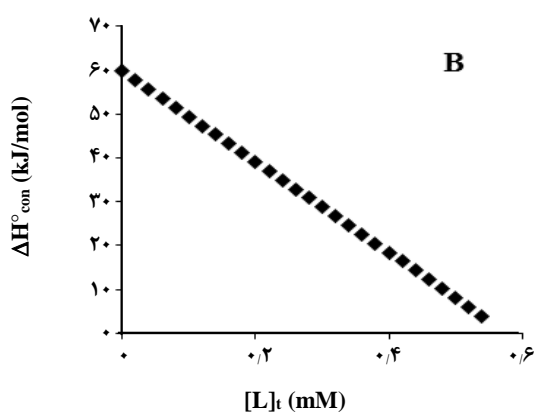
برای هر یک از نمودارها، بزرگ‌تر بودن (مثبت‌تر بودن) عرض از مبدأ، که بیانگر $\Delta G^0_{(H_2O)}$ می‌باشد، پایداری بیش‌تر پروتئین را نشان می‌دهد و با افزایش دما این انرژی کاهش می‌یابد. شیب این منحنی‌ها، m میزان قدرت غیرطبیعی‌کنندگی کمپلکس را نشان می‌دهد. مقدارهای m و $\Delta G^0_{(H_2O)}$ مربوط به غیرطبیعی شدن پروتئین در حضور کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین در جدول ۱ آورده شده است. مقدار انرژی لازم برای غیرطبیعی کردن پروتئین با $\Delta H^0_{\text{conformation}}$ یا $\Delta H^0_{\text{denaturation}}$ معرفی می‌شود که در بازه‌ی دمایی ۲۷°C تا ۳۷°C با برون‌یابی نمودار ΔH^0 در مقابل غلظت کل کمپلکس تا غلظت صفر کمپلکس قابل دستیابی است و نتیجه بسیار مهمی در فرایند غیرطبیعی شدن پروتئین به شمار می‌آید. نمودارهای تغییرهای آنتالپی غیرطبیعی شدن HSA توسط دو کمپلکس در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. نمودار تغییرهای آنتالپی سامانه‌های Pd(II)-HSA و Pt(II)-HSA کاهش می‌باشد. یعنی با افزایش غلظت کمپلکس، پایداری HSA-complex کاهش می‌یابد و فرایند غیرطبیعی شدن سرم آلبومین در حضور این کمپلکس‌ها گرمازا می‌باشد.

در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس برای هر دو ترکیب نشان می‌دهد ترکیب پلاتین پتانسیل بهتری نسبت به پالادیوم در برهم‌کنش غیرطبیعی شدن پروتئین از خود نشان می‌دهد. کوچک بودن این مقادیر نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و نشان می‌دهد این ترکیب‌ها نسبت به کمپلکس‌های گزارش شده با ویژگی‌های ضد سرطانی، HSA را در غلظت‌های میکرومولار غیر طبیعی می‌کنند و کم‌تر به ساختار پروتئین آسیب می‌رسانند و می‌تواند عوارض جانبی کم‌تری به دنبال داشته باشد. پارامترهای ترمودینامیکی در فرایند غیرطبیعی شدن سرم آلبومین انسانی توسط دو کمپلکس پالادیوم و پلاتین با به‌کارگیری داده‌های منحنی غیرطبیعی شدن، یعنی پارامترهای K و ΔG^0 در هر دو دما به‌دست آمده و منحنی ΔG^0 در برابر $[L]_t$ در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس رسم شد که در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

شکل ۳ نشان می‌دهد با افزایش غلظت کمپلکس، انرژی ΔG^0 کاهش می‌یابد که این به دلیل کاهش پایداری پروتئین در حضور کمپلکس و افزایش دما می‌باشد [۱۷]. با تعیین معادله خط



شکل ۳- نمودار تغییر انرژی آزاد گیبس (ΔG°) در برابر $[L]_t$ مربوط به برهم کنش HSA با کمپلکس‌های $[\text{Pd}(\text{bpy})(\text{Et-dtc})]\text{NO}_3$ (A) و $[\text{Pt}(\text{bpy})(\text{Et-dtc})]\text{NO}_3$ (B) در دو دمای 27°C و 37°C .



شکل ۴- نمودار تغییر آنتالپی کنفورماسیون HSA در برابر $[L]_t$ مربوط به غیرطبیعی شدن HSA در حضور کمپلکس‌های $[\text{Pd}(\text{bpy})(\text{Et-dtc})]\text{NO}_3$ (A) و $[\text{Pt}(\text{bpy})(\text{Et-dtc})]\text{NO}_3$ (B) در محدوده دمای 27°C تا 37°C .

روند نزولی مقدارهای انرژی آزاد گیبس، اتصال کمپلکس فلزی به پروتئین خود به خودی است. مثبت بودن مقدارهای ΔH° و ΔS° نشان دهنده برهمکنش هیدروفوبی کمپلکس با پروتئین می باشد. به عبارت دیگر عمده اتصال بخش هیدروکربنی کمپلکس با پروتئین به صورت هیدروفوبی در نظر گرفته می شود [۱۸].

بررسی پارامترهای پیوندی با تغییرهای شدت فلونورسانس پروتئین با افزایش کمپلکس‌های فلزی

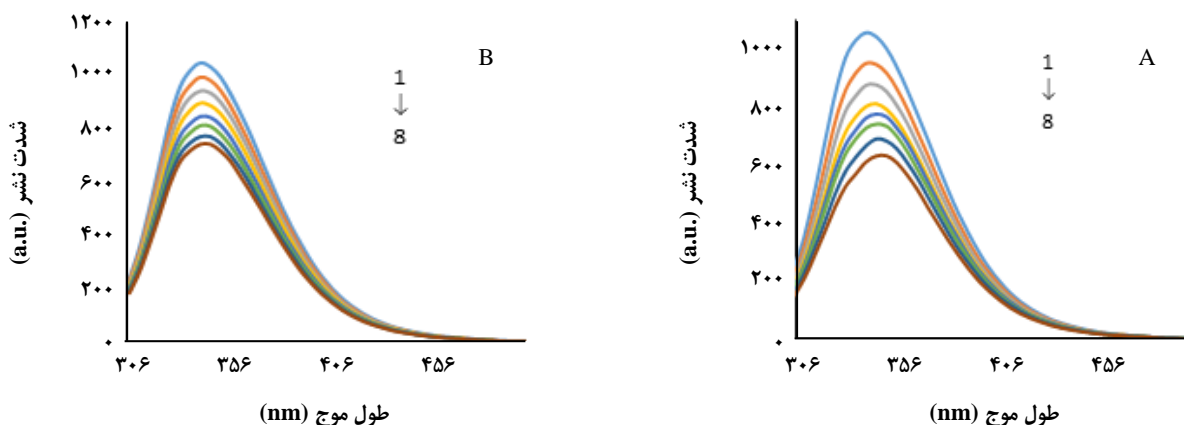
اندازه‌گیری شدت نشر فلونورسانس HSA (با غلظت 0.8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با افزایش غلظت‌های متفاوت (50 تا 200 میکرومولار) کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین انجام شد.

نیروهای برهم‌کنش بین مولکول‌های کمپلکس و بیوماکرومولکول‌ها می‌تواند شامل نیروهای هیدروفوبیک، واندروالس، پیوند هیدروژنی و الکتروستاتیک باشند. پارامترهای ترمودینامیکی در تعیین نوع نیروهای برهم‌کنش می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. برای این منظور می‌توان به کمک روابط زیر، پارامترهای ترمودینامیکی برهم‌کنش کمپلکس و پروتئین را محاسبه نمود.

$$\ln(K_2/K_1) = (-\Delta H^\circ/R)(1/T_2 - 1/T_1) \quad (2)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (3)$$

مقدارهای به‌دست آمده از این معادله‌ها برای برهمکنش کمپلکس و پروتئین در جدول ۱ نشان داده شده است. به دلیل



شکل ۵ - طیف‌های نشری فلئورسانس برای برهم‌کنش پروتئین در نبود کمپلکس‌ها (۱) و حضور غلظت‌های متفاوت ۰/۵ (۲)، ۰/۱ (۳)، ۰/۱ (۴)، ۰/۱۲۵ (۵)، ۰/۱۵ (۶)، ۰/۱۷۵ (۷) و ۰/۲ (۸) میلی مولار از کمپلکس‌های A: $[Pd(bpy)(Et-dtc)]NO_3$ و B: $[Pt(bpy)(Et-dtc)]NO_3$ در دمای محیط.

می‌باشند [۲۱]، مقدارهای ثابت‌های تعادلی استرن - وولمر از شیب منحنی‌های F_0/F در برابر $[HSA]$ قابل حصول است. همچنین با به‌کارگیری معادله خطی (۴)، یعنی $\log((F_0-F)/F)$ در برابر $\log[HSA]$ ، برای هر دو کمپلکس در برهم‌کنش با پروتئین ثابت پیوند (K_f) و تعداد مکان‌های اتصال (n) محاسبه می‌شوند.

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_f + n \log[com] \quad (2)$$

نتیجه‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد مقدار kq بزرگ‌تر از $M^{-1}s^{-1} \times 10^{10}$ می‌باشد که بیانگر این می‌باشد که احتمال دارد خاموشی از نوع استاتیک باشد به عبارت دیگر با تشکیل کمپلکس با پروتئین خاموشی رخ می‌دهد.

مطالعه طیف CD و بررسی تغییر ساختار پروتئین در حضور کمپلکس

تقارن ساختمانی موجود در یک درشت مولکول زیستی ویژه مانند پروتئین منجر به ایجاد تفاوت در جذب نور پلاریزه چپ گردان در مقابل راست گردان می‌شود که اندازه‌گیری این تفاوت توسط طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی انجام می‌گیرد.

به‌طور معمول برای بررسی درصد ساختار مارپیچ آلفای پروتئین از نسبت بیضی‌واری مولی^(۳) (θ_M) در ۲۲۲ نانومتر به بیضی‌واری مولی در ۲۰۸ نانومتر ($[\theta]_{208}/[\theta]_{222}$) استفاده می‌شود [۲۲]. همچنین برای مطالعه ساختار دوم پروتئین از طیف‌گیری

طیف نشری پروتئین طبیعی (بدون حضور کمپلکس) و پروتئین در حضور غلظت‌های گوناگون کمپلکس پالادیوم و پلاتین در دمای محیط، در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

روشن است که خاموشی طیف فلئورسانس اشاره به هر فرایندی دارد که شدت فلئورسانس را کاهش دهد. برهم‌کنش‌های متنوع گوناگونی سبب خاموش شدن فلوروفور می‌شوند که شامل واکنش‌های حالت تهییج، نوآرایی مولکولی، انتقال انرژی، تشکیل کمپلکس مرحله‌ی پایه و خاموشی ناشی از برخورد می‌باشد. در حقیقت دو فرایند خاموشی مشهور وجود دارد؛ استاتیک^(۱) و دینامیک^(۲) که در هر دوی این فرایندها باید بین خاموش‌کننده و فلوروفور ارتباط برقرار شود. خاموشی دینامیک به فرایندی اشاره می‌کند که خاموش‌کننده - فلوروفور با ایجاد حالت واسطه‌ای در حالت برانگیخته با هم برخورد می‌کنند. خاموشی استاتیک به تشکیل کمپلکس خاموش‌کننده - فلوروفور اشاره می‌کند که این دو مدل از نظر وابستگی دمایی و طول عمر حالت برانگیخته از یکدیگر قابل تشخیص هستند [۱۹]. پس در هر دو مورد شدت فلئورسانس به غلظت خاموش‌کننده بستگی دارد و خاموش‌کننده - فلوروفور به عنوان یک عامل خاموشی است [۲۰].

با در نظر گرفتن رابطه استرن - وولمر $F_0/F = 1 + k_q T_0 [Q]$ ، $1 + K_{sv} [Q]$ که در آن F_0 و F به ترتیب شدت فلئورسانس در حضور و غیاب خاموش‌کننده و kq ثابت سرعت خاموشی فلوروفور در غیاب خاموش‌کننده ($T_0 = 10^{-8}$) و $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده

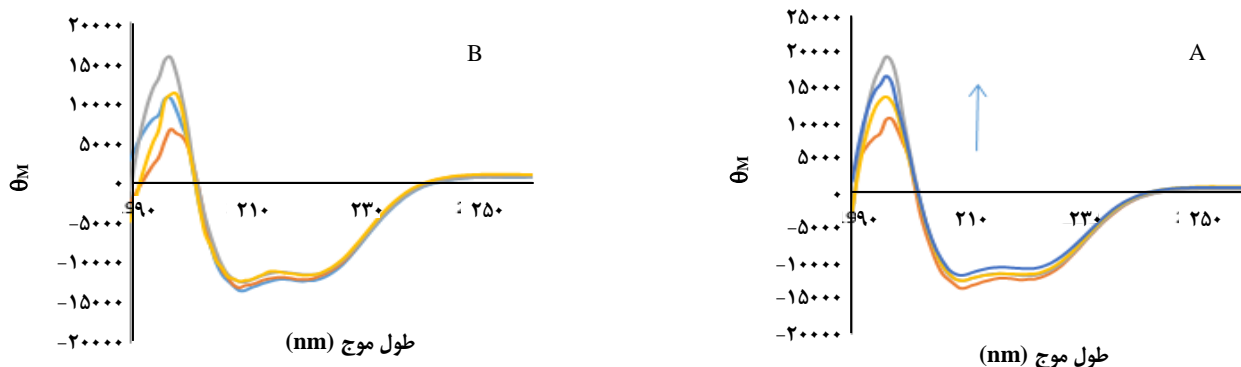
(۱) Static

(۲) Dynamic

(۳) Molar ellipticity

جدول ۲ - پارامترهای اتصالی کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین به پروتئین HSA از رابطه استرن - وولمر در دمای محیط.

کمپلکس	$K_{sv} \times 10^3 (M)^{-1}$	$k_q \times 10^{11} (M.s)^{-1}$	R^2	$K_b \times 10^3 (M)^{-1}$	n	R^2
[Pd(bpy)(Et-dtc)]NO ₃	۱۲٫۵	۱۲٫۵	۹۹	۱۰٫۴	۰٫۹	۹۹
[Pt(bpy)(Et-dtc)]NO ₃	۴۱٫۲	۴۱٫۲	۹۹	۶۳٫۵	۱٫۱	۹۹



شکل ۶ - منحنی‌های CD ناحیه دور سرم آلبومین انسانی با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در غیاب (a) کمپلکس پالادیوم (A) و کمپلکس پلاتین (B) و در حضور غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار (b-d) در دمای محیط.

پیوند هیدروژنی و ساختمان دوم پروتئین می‌شود. همچنین افزون بر از بین رفتن مارپیچ آلفا، واپس‌نش پلی پپتید HSA رخ می‌دهد و موجب می‌شود گروه آبگریز بیش‌تری در معرض نور قرار گیرند. میزان تغییرها در محتوای ساختار دوم HSA در حضور غلظت‌های گوناگون هر دو کمپلکس پلاتین و پالادیوم به کمک نرم افزار Avive محاسبه شد و در جدول ۳ گزارش شده‌اند. در طیف‌های CD پیش و پس از افزودن کمپلکس پالادیوم و پلاتین تغییر مارپیچ آلفا به ترتیب ۵ و ۳ درصد دیده می‌شود که این نشان می‌دهد ساختمان غالب HSA در سامانه، مارپیچ آلفا باشد [۲۳].

با توجه به طیف‌های ناحیه نزدیک CD پروتئین می‌توان به این نتیجه رسید که از آنجایی که ناحیه نزدیک CD در واقع بیانگر تغییرهای زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آروماتیک، که در بازه‌ی ۲۹۰-۲۵۰ نانومتر جذب دارند، می‌باشد و تاخوردگی زنجیره‌های جانبی در محیط کایرال قرار گیرند، طیف CD به دست آمده می‌تواند به عنوان طیف ویژه ساختمان طبیعی پروتئین مورد بررسی قرار گیرد. از سویی طیف CD در ناحیه فرابنفش نزدیک، حساس به محیط اطراف زنجیره‌های آروماتیک مانند تربیتوفان در ۲۹۰ نانومتر، تایروزین در ۲۸۲-۲۵۸ نانومتر و فنیل آلانین در ۲۷۰-۲۵۵ نانومتر می‌باشد.

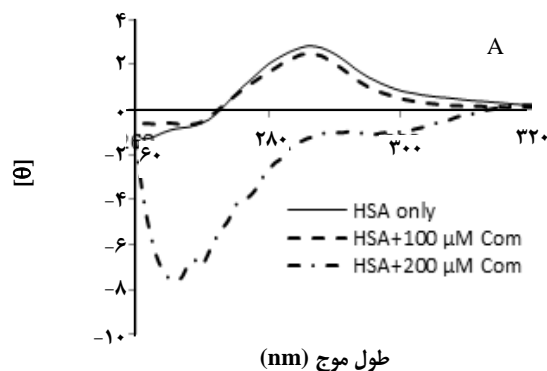
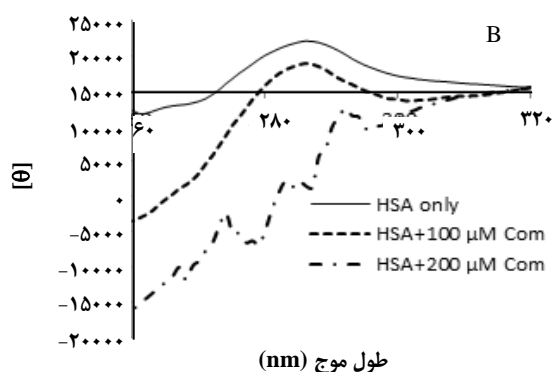
ناحیه دور CD، که ناشی از جذب پیوندهای پپتیدی می‌باشد، و طیف‌گیری ناحیه نزدیک CD، که ناشی از جذب اسیدهای آمینه آروماتیک است، کمک گرفته می‌شود.

به منظور بررسی اثر دو کمپلکس پالادیوم و پلاتین بر ساختار سرم آلبومین انسانی، آزمایش‌های طیف‌سنجی CD در ناحیه‌های فرابنفش دور و نزدیک انجام شد. طیف‌های مربوط به ناحیه فرابنفش دور به این دلیل گرفته می‌شود که بررسی‌های ناحیه دور UV منطبق بر جذب پیوند پپتیدی است و امکان بررسی ساختار دوم پروتئین به صورت کمی را فراهم می‌کند. به عبارت دیگر درصد ساختار دوم شامل مارپیچ آلفا، صفحه‌های بتا، پیچ‌های بتا و پیچ نامنظم (رندوم کوئل) محاسبه می‌شود. آزمایش‌های دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور پروتئین با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر تریس در دمای محیط در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کمپلکس پالادیوم یا پلاتین بین طول موج‌های ۲۰۰ تا ۲۶۰ نانومتر ثبت شد که در شکل ۶ نشان داده شده‌اند.

کاهش θ_M در شکل ۶ نشان دهنده از بین رفتن ساختار مارپیچ آلفا می‌باشد که ممکن است به دلیل پیوند کمپلکس به گروه‌های اسیدآمینه زنجیره پلی پپتید HSA باشد و موجب تخریب شبکه

جدول ۳- تغییرهای در محتوای ساختار دوم HSA در اثر برهم‌کنش با غلظت‌های گوناگون کمپلکس پالادیوم و پلاتین.

غلظت کمپلکس (μM)	%α-Helix	%β sheet	%β turn	%Random coil
[Pd(bpy)(Et-dtc)]NO ₃				
۰	۴۰٫۴	۱۳٫۸	۱۵٫۷	۲۷٫۳
۱۰۰	۳۸٫۶	۱۴٫۷	۱۶	۲۸٫۹
۲۰۰	۳۷٫۸	۱۵٫۰	۱۶٫۱	۲۹٫۱
۳۰۰	۳۵٫۸	۱۶٫۰	۱۶٫۵	۳۰٫۶
[Pt(bpy)(Et-dtc)]NO ₃				
۰	۴۰٫۴	۱۳٫۸	۱۵٫۷	۲۷٫۳
۱۰۰	۳۹٫۵	۱۴٫۲	۱۵٫۹	۲۸٫۰
۲۰۰	۳۸٫۳	۱۴٫۹	۱۶٫۰	۲۹٫۱
۳۰۰	۳۷٫۷	۱۵٫۱	۱۶٫۲	۲۸٫۸



شکل ۷- طیف‌های CD ناحیه نزدیک سرم آلبومین انسانی با غلظت ۰٫۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در غیاب (A) کمپلکس پالادیوم و (B) کمپلکس پلاتین و در حضور غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در دمای محیط.

نتیجه‌گیری

در بین لیگاندهای دارای اتم دهنده سولفور، دی اتیل دی تیو کربامات (DDTC) می‌تواند پیوند سیس پلاتین هیدرولیز شده را با گروه -SH از سیستمین موجود در پروتئین‌های جدار نفرون‌ها برگشت داده و خود جایگزین شده و سمیت کلیوی تا حد زیادی پس از تزریق کاهش یابد و به راحتی از طریق ادرار دفع می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهد خوشبختانه DDTC تأثیری بر پیوند تشکیل شده بین سیس پلاتین و DNA در سلول سرطانی ندارد.

طیف CD پروتئین با غلظت ۰٫۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر تریس در دمای محیط در ناحیه نزدیک UV در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار کمپلکس پالادیوم یا پلاتین بین طول موج‌های ۲۶۰ تا ۳۲۰ نانومتر ثبت شد که در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. طیف‌های شکل ۷ نشان می‌دهند که در هر دو مورد با افزایش غلظت‌های بالای کمپلکس، زنجیره‌های جانبی دستخوش تغییر شده و این خود بیانگر تغییر در ساختمان دوم پروتئین و اتصال کمپلکس به HSA می‌باشد [۲۴، ۲۵].

هیدرولیز و پایداری بیشتر این ترکیب‌ها می‌باشد. شیوه‌های پیوندی این کمپلکس‌ها با پروتئین به کمک طیف سنجی فلورئورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی بررسی شد و مشخص شد با تشکیل کمپلکس-پروتئین خاموشی استاتیک رخ می‌دهد و نتیجه‌ها حاکی از این است که تعداد جایگاه اتصال و ثابت اتصال پیوندی برای ترکیب پلاتین بیشتر از پالادیوم در برهم‌کنش با پروتئین می‌باشد و اتصال قویتر کمپلکس پلاتین به پروتئین را نسبت به پالادیوم نشان می‌دهد. در طیف‌های CD نیز تغییر ماریچ آلفا به میزان ۵ و ۳ درصد به ترتیب با افزودن کمپلکس پالادیوم و پلاتین تعیین شد که این نشان می‌دهد ساختمان غالب HSA در سامانه، ماریچ آلفا باشد.

قدردانی

نویسندگان از پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران و دانشگاه سیستان و بلوچستان برای انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۳

از این رو شاید به جای استفاده از DDTC همراه با سیس پلاتین به‌توان از کمپلکس‌های DDTC با پلاتین در شیمی درمانی استفاده نمود و به عنوان مدل معتبر برای مطالعه چگونگی کتوردیناسیون پروتئین به این کاتیون‌های فلزی معرفی نمود [۱۴]. بنابراین در این پژوهش، کمپلکس محلول در آب با فلزهای پلاتین و پالادیوم به فرمول کلی $[M(bpy)(L)]NO_3$ (که در آن‌ها $bpy = 2,2',2''$ -بی‌پیریدین، $Pt(II) = M$ و $Pd(II) = L$ یا اتیل دی‌تیوکربامات است) انتخاب شده و برهم‌کنش این کمپلکس‌ها با HSA به روش تیتراسیون همدم UV-Vis در تریس بافر دارای سدیم کلرید (۱۰ میلی مولار) و $pH=7.4$ در دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس مطالعه شد. در بررسی برهم‌کنش کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین با HSA، پارامترهای پیوندی و پارامترهای ترمودینامیکی تعیین شدند و دیده شد با افزایش غلظت کمپلکس، پایداری پروتئین کاهش می‌یابد و فرایند غیرطبیعی شدن سرم آلبومین در حضور این کمپلکس‌ها گرمازا می‌باشد. بخش عمده اتصال هر دو کمپلکس از بخش هیدروکربنی ترکیب با پروتئین صورت می‌پذیرد که بیش‌ترین برهم‌کنش را می‌توان به‌صورت آب دوستی در نظر گرفت. نتیجه‌ها نشان داد ترکیب پلاتین نسبت به پالادیوم در برهم‌کنش با پروتئین پتانسیل بهتری دارد که این نیز در راستای برتری ترکیب‌های پلاتین نسبت به پالادیوم در بین ترکیب‌های دارویی بوده و ناشی از سرعت پایین

مراجع

- [1] Yang N., Sheridan A.M., "Reference Module in Biomedical Sciences Encyclopedia of Toxicology", 4th ed., USA, Elsevier, 753-758 (2013).
- [۲] منصوری ترشیزی، حسن؛ جهانگیری، سمیرا؛ بابایی زاچ، ملیحه؛ خدابخشی کنگان، زهرا؛ نژستی، فریده؛ حیدری مجد، مصطفی؛ تهیه، شناسایی، ویژگی‌های ضدتومور، برهم‌کنش با DNA و تأثیر بار الکتریکی موجود روی نسبت‌های مولی گوناگون کمپلکس‌های $Pd(II):Zn(II)$ در "ترکیب درمانی" آن‌ها، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲): ۳۶ تا ۵۵: ۶۹ (۱۳۹۶).
- [3] Imran A., Waseem A.W., Kishwar S., Ashanul H., *Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy, Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **13**: 296-306 (2013).
- [4] Kelland L., *The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy, J. Appl. Biomed.*, **7**: 573-584 (2007).

- [5] Abramkin S.A., Berger W., Jungwirth U., Jakupec M.A., Valiahdi S.M., Hartinger C.G., Dworak C., Nazarov A.A., Habala L., Meelich K., Galanski M., Keppler B.K., [{\(1R,2R,4R\)-4-Methyl-1,2-cyclohexanediamine} oxalatoplatinum\(II\): A Novel Enantiomerically Pure Oxaliplatin Derivative Showing Improved Anticancer Activity in Vivo](#), *J. Med. Chem.* **53**: 7356–7364 (2010).
- [6] Trudu F., Amato F., Vaňhara P., Pivetta T., Peña-Méndez E.M., Havel J., [Coordination compounds in cancer: Past, Present and Perspectives](#), *J. Appl. Biomed.*, **13**: 79-103 (2015).
- [7] Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Björkqvist A.M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T., Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy M.L., Lushnikova T., Monni O., Pere H., Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V.M., Wolf M., Zhu Y., [DNA Copy Number Losses in Human Neoplasms](#), *American Journal of Pathology*, **155**: 683-694 (1999).
- [8] Jain N., Paul A.K., Srivastava T.S., [Synthesis, Characterization, Cytotoxicity and DNA Binding Studies of Diamminediethyldithiocarbamate-Platinum\(II\) Nitrate](#), *J. Inorg. Biochem.*, **45**(2): 123-127 (1992).
- [9] Eslami Moghadam, M., Saidifar, M., Divsalar, A., Mansouri-Torshizi, H., Saboury, A. A., Farhangian, H., & Ghadamgahi, M. [Rich Spectroscopic and Molecular Dynamic Studies on the Interaction of Cytotoxic Pt \(II\) and Pd \(II\) Complexes of Glycine Derivatives with Calf Thymus DNA](#), *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **34**(1): 206-222 (2016).
- [10] 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).
- [11] Eslami Moghadam M., Divsalar A., Abolhosseini Shahrnoy A., Saboury, A.A. [Synthesis, Cytotoxicity Assessment, and Interaction and Docking of Novel Palladium\(II\) Complexes of Imidazole Derivatives with Human Serum Albumin](#), *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**(8): 1751–1762 (2016).
- [12] Holford J., Beale P.J., Boxall F.E., [Mechanism of Drug Resistance to the Platinum Complex ZD0473 in Ovarian Cell Line](#), *Eur. J. Cancer*, **36**(15): 1984-1990 (2000).
- [13] Kantoury M., Eslami Moghadam M., Tarlani A.A., Divsalar A., [Structure Effect of Some New Anticancer Pt \(II\) Complexes of Amino Acid Derivatives with Small Branched or Linear Hydrocarbon Chains on Their DNA Interaction](#), *Chemical Biology & Drug Design*, **88**(1): 76-87 (2016).
- [14] Islami-Moghaddam M., Mansouri-Torshizi H., Divsalar A., Saboury A.A., [Synthesis, Characterization, Cytotoxic and DNA Binding Studies of Diimine Platinum\(II\) and Palladium\(II\) Complexes of Short Hydrocarbon Chain Ethyldithiocarbamate Ligand](#), *J. Iran. Chem. Soc.*, **6**(3): 552-569 (2009).
- [15] Saeidifar M., Mansouri-Torshizi H., Palizdar Y., Eslami-Moghaddam M., Divsalar A., Saboury A.A., [Synthesis, Characterization, Cytotoxicity and DNA Binding Studies of a Novel Anionic Organopalladium \(II\) Complex](#), *Acta Chimica Slovenica*, **61**(1): 126-36 (2014).

- [16] Mansouri-Torshizi H., I-Moghaddam M., Divsalar A., Saboury A.A., 2,2 - Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and Palladium(II) Complexes: Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, and Rich DNA-Binding Studies, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**: 9616-9625 (2008).
- [17] Mansouri-Torshizi H., Divsalar A., Eslami-Moghadam M., Saboury A.A., DNA-Binding Studies of Some Potential Antitumor 2,2'-bipyridine Pt(II)/Pd(II) Complexes of Piperidinedithiocarbamate. Their Synthesis, Spectroscopy and Cytotoxicity, *Acta Chim. Slov.* **58**: 811-822 (2011).
- [18] Ajloo D., Eslami Moghadam M., Ghadimi K., Ghadamgahi M., Saboury A.A., Divsalar A., Sheikh Mohammadi M., Yousefi K., Synthesis, Characterization, Spectroscopy, Cytotoxic Activity and Molecular Dynamic Study on the Interaction of Three Palladium Complexes of Pphenanthroline and Glycine Derivatives with Calf Thymus DNA, *Inorg. Chim. Acta*, **430**: 144-160 (2015).
- [19] Wakasa M., Takamori Y., Takayanagi T., Orihara M., Kugita T., Re-Examination of the Photochemical Reaction of Octaisopropylcyclotetragermane, *J. Organomet. Chem.*, **692**(14): 2855-2860 (2007).
- [۲۰] اسمعیل زایی، زهره؛ صبوری، علی اکبر؛ منصوری ترشیزی، حسن؛ سعیدی فر، مریم؛ دیوسالار، عادل؛ مطالعه برهمکنش کمپلکس های نیکل، (II) دارای لیگاندهای آروماتیک مسطح با DNA غده تیموس، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، **۳۲**(۲): ۱ تا ۱۳ (۱۳۹۲).
- [20] Esmaeilzai Z., Saboury A.A., Mansouri Torshizi H., Saeidifar M., Divsalar A., Studies of the Interaction of Ni (II) Complexes Bearing Planar Aromatic Ligands with Calf Thymus DNA, *Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran*, **32**(2): 1 (2013).
- [21] Shahraki S., Mansouri-Torshizi H., Heydari A., Ghahghaei A., Divsalar A., Saboury A., Zareian S., Platinum (II) and Palladium (II) Complexes with 1, 10-Phenanthroline and Pyrrolidinedithiocarbamate Ligands: Synthesis, DNA-Binding and Anti-Tumor Activity in Leukemia K562 Cell Lines, *Iranian Journal of Science and Technology*, **39**(A2): 187 (2015).
- [22] Mandal P., Bardhan M., Ganguly T., A Detailed Spectroscopic Study on the Interaction of Rhodamine 6G with Human Hemoglobin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **99**(2): 78-86 (2010).
- [23] Divsalar A., Khodabakhshian S., Probing the Binding Site of a New Synthesized Anti-Cancer Compound to HSA via Competitive Ligand Binding Method, *J. Mol. Liq.*, **206**: 82-88 (2015).
- [24] Dockal M., Cater D.C., Rüker F., The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin, Structural Characterization and Ligand Binding Properties, *J. Biol. Chem.*, **274**(41): 29303-29310 (1999).
- [25] Topala T., Bodoki A., Oprean L., Oprean R., Experimental Techniques Employed in the Study of Metal Complexes-DNA Interactions, *Farmacia*, **62**(6): 1049-1061 (2014).