



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>

Research Article

Synthesis and characterization of cyclometalated Pd(II) complex bearing tyrosine: Experimental and theoretical study of interaction with biomacromolecules

Sedigheh Abedanzadeh^{a,*} , Mahsa Khaghani Azar^a, Bagher Davaeil^b^aDepartment of Chemistry, Kharazmi University, Tehran, Iran^bInstitute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 17/May/2023

Revised: 15/Jul/2023

Accepted: 17/Jul/2023

Keywords:

Palladacycle, Aminoacid, DNA, BSA, Molecular docking

ABSTRACT

Considering the important role of bioactive ligands in designing antitumor complexes, mononuclear C[^]C-cyclometalated Pd (II) complex containing amino acid, tyrosine, was synthesized and identified using Fourier-transform infrared (FT-IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic methods. The interaction of the synthesized mononuclear complex with the biomacromolecules, deoxyribonucleic acid (DNA) and bovine serum albumin (BSA), was studied by UV-Vis absorption and fluorescence emission. Based on the experimental studies, an intercalating mode was proposed for the interaction between the complex and DNA. The UV-Vis absorption and fluorescence emission spectroscopies indicated the high affinity of the complex for BSA binding. Molecular docking calculations revealed that the hydrophobic interactions play important roles in complex – BSA binding.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.30417.2176>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

* Corresponding author: Assistant Professor of Inorganic Chemistry. Email address: abedanzadeh@khu.ac.ir

How to cite this article: Abedanzadeh, S., Khaghani Azar, M., & Davaeil, B. (2023). Synthesis and characterization of cyclometalated Pd (II) complex bearing tyrosine: Experimental and theoretical study of interaction with biomacromolecules. *Applied Chemistry*, 18(68), 217-234. (in Persian)

سنتز و شناسایی کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) حاوی لیگاند تیروزین: مطالعات

تجربی و نظری برهمکنش با ماکرومولکول های زیستی

صدیقه عابدان زاده^۱، مهسا خاقانی آذر^۱، باقر دوائیل^۲

^۱دانشکده شیمی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۲مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۲۶/۰۴/۰۲

تاریخ تصحیح: ۲۴/۰۴/۰۲

تاریخ دریافت: ۲۷/۰۲/۰۲

چکیده

با توجه به اهمیت لیگاندهای زیست فعال در طراحی و ساخت ترکیبات با ویژگی ضدتوموری، کمپلکس تک هسته‌ای C^N -سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی آمینواسید تیروزین سنتز شد و با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) و رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) مورد شناسایی قرار گرفت. برهمکنش کمپلکس تک هسته‌ای سنتز شده با ماکرومولکول های حیاتی دنوکسی ریبونوکلیئیک اسید (DNA) و سرم آلبومین گاوی (BSA)، به وسیله تکنیک‌های تجربی طیف‌سنجی جذب مرئی-فرابنفش (UV-Vis) و طیف‌سنجی نشر فلورسور سانس مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات تجربی نشان‌دهنده برهمکنش از نوع اینترکلیشن میان کمپلکس و DNA است. نتایج حاصل از روش‌های طیف‌سنجی جذب مرئی-فرابنفش و نشر فلورسور سانس نشان‌دهنده برهمکنش قابل توجه میان کمپلکس و پروتئین BSA است. همچنین، طبق نتایج حاصل از محاسبات داکینگ مولکولی، کمپلکس به جایگاه‌های آب‌گریز پروتئین BSA اتصال یافته‌است.

کلمات کلیدی: پالاداسیکل، آمینواسید، DNA، BSA، داکینگ مولکولی.

۱- مقدمه

سرطان سالانه باعث مرگ تقریباً ده میلیون نفر در سراسر جهان می‌شود [۱]. نیمی از بیماران سرطانی با استفاده از داروهای ضدسرطان بر پایه پلاتین مانند سیس‌پلاتین، کربوپلاتین و اگزالی پلاتین که از مهم‌ترین داروهای شیمی‌درمانی هستند تحت درمان قرار می‌گیرند [۲]. استفاده از سیس‌پلاتین و مشتقات نسل دوم و سوم آن، به دلیل بروز عوارض جانبی غیرقابل چشم‌پوشی روی کبد، کلیه، مغز و مشکل ذاتی یا ایجاد مقاومت در برخی از انواع تومورها محدود شده‌است [۳]. برای غلبه بر محدودیت‌های شناخته شده داروهای ضدسرطان، در سال‌های اخیر تلاش‌ها بر روی طراحی و ساخت کمپلکس‌های فلزی متنوع با کارایی بیشتر و عوارض کمتر متمرکز شده‌است [۴-۸]. به دلیل شباهت شیمی کوفوردیناسیون پالادیوم با پلاتین، پژوهش‌هایی بر روی طراحی کمپلکس‌های پالادیوم و کاربرد آن‌ها به عنوان داروهای ضدسرطان صورت گرفته‌است [۹-۱۱]. فعالیت زیستی قابل توجه برخی از این ترکیبات در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی نسبت به سیس‌پلاتین در برابر چندین رده سلول سرطانی و همچنین نحوه عملکرد آن‌ها، دلایل اصلی افزایش محبوبیت ترکیبات پالادیوم در حوزه دارو و درمان هستند [۱۲].

کمپلکس‌های سیکلومتاله یک خانواده مهم از ترکیبات آلی فلزی هستند. از کاربردهای برجسته کمپلکس‌های سیکلومتاله می‌توان به استفاده از آن‌ها در حوزه‌های مرتبط با سنتز [۱۳-۱۶]، کاتالیست [۱۷-۲۲]، علم مواد [۲۴ و ۲۳] و علوم زیستی [۲۶ و ۲۵] اشاره کرد. در واکنش سیکلومتاله شدن، عموماً طی اتصال هترواتم در لیگاند معین و در ادامه با ایجاد یک پیوند درون مولکولی، حلقه کی‌لیت دارای پیوند سیگما فلز-کربن شکل خواهد گرفت. در کمپلکس‌های سیکلومتاله، تشکیل حلقه کی‌لیت طی واکنش سیکلومتاله شدن منجر به پایداری قابل توجه در کمپلکس خواهد شد. از آن‌جاکه در محیط‌های زیستی انواع مولکول‌ها با قدرت کوئورینه‌شوندگی و واکنش‌پذیری متفاوت موجود است، از دید ساختاری کمپلکس‌های سیکلومتاله گزینه‌های ارزشمندی برای طراحی داروهای بر پایه فلز محسوب می‌شوند. از همین‌رو، در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه کاربرد زیستی این ترکیبات توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف به چاپ رسیده‌است [۲۷-۲۹].

با توجه به نوع هترواتم، لیگاندهای متنوعی در طراحی و سنتز کمپلکس‌های سیکلومتاله مورد بررسی واقع شده‌اند [۳۰]. یکی از مهم‌ترین انواع لیگاندهای سیکلومتاله، ایلیدها هستند. ایلید، کربانیونی است که به‌صورت مستقیم به هترواتم با بار قراردادی مثبت پیوند یافته‌است و این بار مثبت ناشی از تعداد پیوندهای سیگما میان هترواتم و استخلاف‌های پیوندشده به آن می‌باشد. وجود بار منفی بر روی مرکز ایلیدی کربانیون، منبع بروز رفتار شیمیایی ایلید و در نتیجه توانایی در استفاده از آن‌ها به‌عنوان لیگاند در پیوند به فلزهای واسطه‌است. پایداری و واکنش‌پذیری کربانیون تحت تاثیر پارامترهای القایی و میزان غیرمستقری بار، متغیر خواهد بود. ایلیدها به دلایل فراوان از جمله تنوع ساختاری، روش‌های سنتز گوناگون، سهولت تغییر در خواص الکترونی و فضایی لیگاند، به‌طور فراوان در شیمی آلی فلزی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۱].

کمپلکس‌های فلزات واسطه در بدن موجود زنده عموماً به‌وسیله برهمکنش با DNA سلول سرطانی، موجب مرگ آن می‌گردند [۳۲-۳۴]. لازم به‌ذکر است که مولکول DNA در برابر ترکیبات گوناگون مکان‌های پیوندی متنوعی را پیشنهاد می‌کند. با توجه به مقالات منتشر شده، کمپلکس‌های کوئوردیناسیون قادر هستند به شیوه‌های برگشت‌ناپذیر (پیوند کووالانسی یا کوئوردینانسی) و برگشت‌پذیر (تجمع بین مولکولی) به DNA پیوند یابند. از سوی دیگر، آلبومین- پروتئین محلول در آب که در بدن انسان از نظر مقدار و کارکرد از مهم‌ترین مواد درون پلاسما می‌باشد- در سیستم گردش خون به‌ویژه از نظر حمل دارو، نقش مهمی را ایفا می‌کند. این پروتئین دارای دو جایگاه اصلی برای پیوند دارو می‌باشد. در سال ۱۹۷۵ سادلو و همکارانش نشان دادند که اکثر داروها به یکی از این دو ناحیه بر روی این پروتئین با تمایل بالا پیوند می‌یابند که این دو ناحیه را جایگاه I یا جایگاه پیوندی وارفارین و جایگاه II یا جایگاه پیوندی ایندول یا بنزودیازپین می‌نامند [۳۵].

با توجه به اهمیت ساختاری کمپلکس‌های سیکلومتاله در طراحی کمپلکس‌های فلزی با ویژگی ضدتوموری [۳۶] و همچنین اهمیت استفاده از گروه‌های دارای فعالیت و سازگاری زیستی در طراحی کمپلکس‌های فلزی، در تحقیق حاضر کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفرایلید حاوی آمینواسید طبیعی تیروزین به‌عنوان یک لیگاند زیست‌فعال سنتز شد و مورد شناسایی

قرار گرفت. در ادامه، مطالعه تجربی و نظری برهمکنش کمپلکس با ماکرومولکول های زیستی DNA و پروتئین BSA مورد بررسی قرار گرفت.

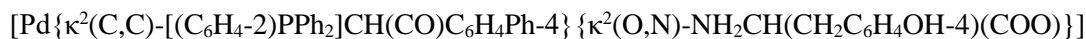
۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاہوری

مواد اولیه و حلال های مورد استفاده در این تحقیق همه از شرکت های Sigma و Merck تهیه شدند. تریس هیدروکلرید، DNA ماهی سالمون و پروتئین آلبومین سرم گاوی BSA نیز از شرکت Sigma خریداری شدند. در تمام مراحل از آب مقطر دیونیزه برای تهیه محلول های آبی مورد نیاز استفاده شد. ترکیب دوهسته ای سیکلومتاله پالادیوم (II) لیگاند فسفرایلید دارای پل کلرید، مطابق روش ارائه شده در مرجع سنتز شده است [۳۷]. طیف های مادون قرمز FT-IR با استفاده از دستگاه RXI FT-IR 2400 Perkin-Elmer به صورت قرص های KBr و برحسب فرکانس در واحد عدد موج (cm^{-1}) ثبت گردیدند. طیف های رزونانس مغناطیسی چند هسته ای ^1H NMR و $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR به وسیله دستگاه Bruker DRX AVANCE به ترتیب با قدرت ۴۰۰ و ۱۶۱ مگاهرتز ثبت شدند. برای ثبت طیف های جذب الکترونی مرئی-فرابنفش UV-Vis از دستگاه SPECORD 210 PLUS Analytikjena و برای ثبت طیف های نشر فلئوئورسانس از دستگاه SHIMADZU RF-5301 استفاده گردید.

۲-۲- روش تهیه کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی لیگاند تیروزین

به ظرف حاوی ۰/۱۲۰ گرم (۰/۱ میلی مول) کمپلکس دوهسته ای $\text{C}^{\wedge}\text{C}$ -سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید دارای پل کلرید [۳۷] در ۱۰ میلی لیتر حلال THF، ۰/۲۵۰ گرم (۰/۲ میلی مول) نقره (I) تری فلئوئورومتان سولفونات افزوده شد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه از شروع واکنش در دمای محیط و در شرایط به دور از نور، مخلوط واکنش بر روی منیزیم سولفات صاف گردید و به محلول زیرصافی ۰/۰۳۶ گرم (۰/۲ میلی مول) آمینواسید تیروزین افزوده شد. پس از گذشت ۴ ساعت، حلال واکنش تحت خلاء تبخیر شد و رسوب باقی مانده با دی اتیل اتر شسته شد و در نهایت خشک و جمع آوری گردید.



Yield: 96.0 mg (63 %) IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{CO}) = 1620$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 1.30$ (s, 2H, NH_2), 2.00–3.50 {aliphatic region}, 5.20 (d, 1H, CHP, $^2\text{J}_{\text{HP}} = 4.5$ Hz), 6.50–8.50 {aromatic region}. $^3\text{P}-\{^1\text{H}\}$ NMR (161.97 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 17.00$ (1P, CHP).

۲-۳- برهمکنش کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی لیگاند تیروزین با DNA

بررسی برهمکنش کمپلکس با DNA با استفاده از تغییرات در طیف جذبی مرئی-فرابنفش صورت گرفته است. غلظت محلول DNA، با توجه به این که ضریب جذب مولی برای DNA برابر $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ می باشد، با استفاده از طیف جذب الکترونی آن مشخص گردید. جهت اطمینان از خلوص محلول DNA، جذب در ۲۶۰ نانومتر نسبت به ۲۸۰ نانومتر برابر با ۱/۸۹ محاسبه

گردید که نشان‌دهنده عدم حضور پروتئین در محلول DNA می باشد. آزمایش‌ها در دمای اتاق و در محیط بافر Tris-HCl ۵ میلی مولار و NaCl ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۴ انجام گرفتند. برای تهیه محلول اصلی کمپلکس، ۱ درصد حجمی/حجمی از حلال DMSO به محلول بافر اضافه گردید. هم چنین، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از DNA ساخته شد و آماده استفاده برای بررسی برهمکنش با کمپلکس گردید. محلول DNA قبل از هر آزمایش به صورت تازه تهیه شد. در این آزمایش، محلول M $5/0 \times 10^{-5}$ از کمپلکس با غلظت ثابت بوسیله محلول DNA با غلظت‌های متغیر M $10^{-5} \times 100-0$ تیترا شد.

۲-۴- برهمکنش کمپلکس تک هسته ای سیکلومتاله پالادیوم (II) حاوی لیگاند تیروزین با پروتئین BSA

برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA در دمای اتاق به وسیله دستگاه‌های طیف سنج جذب الکترونی و نشر فلورئورسانس انجام شد. محلول پروتئین از حل کردن پروتئین BSA در محیط بافر Tris-HCl ۵ میلی مولار و NaCl ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۴ ساخته شد. در روش جذب الکترونی، برای بررسی برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA، نخست محلول پروتئین BSA با غلظت مشخص ۵ میکرومولار تهیه و طیف جذبی آن ثبت شد. در ادامه، مقادیر متفاوتی از کمپلکس به آن اضافه شد و تغییرات در طیف جذب پروتئین BSA ثبت گردید. در روش نشر فلورئورسانس، برای بررسی برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA، نخست طیف نشری محلول پروتئین BSA با غلظت مشخص ۵ میکرومولار ثبت گردید. در مرحله بعد محلول‌هایی با غلظت‌های متغیر از کمپلکس با نسبت‌های مولی مشخص به پروتئین BSA اضافه گردید و تغییرات در طیف فلورئورسانس ثبت گردید.

۲-۵- محاسبات داکینگ مولکولی

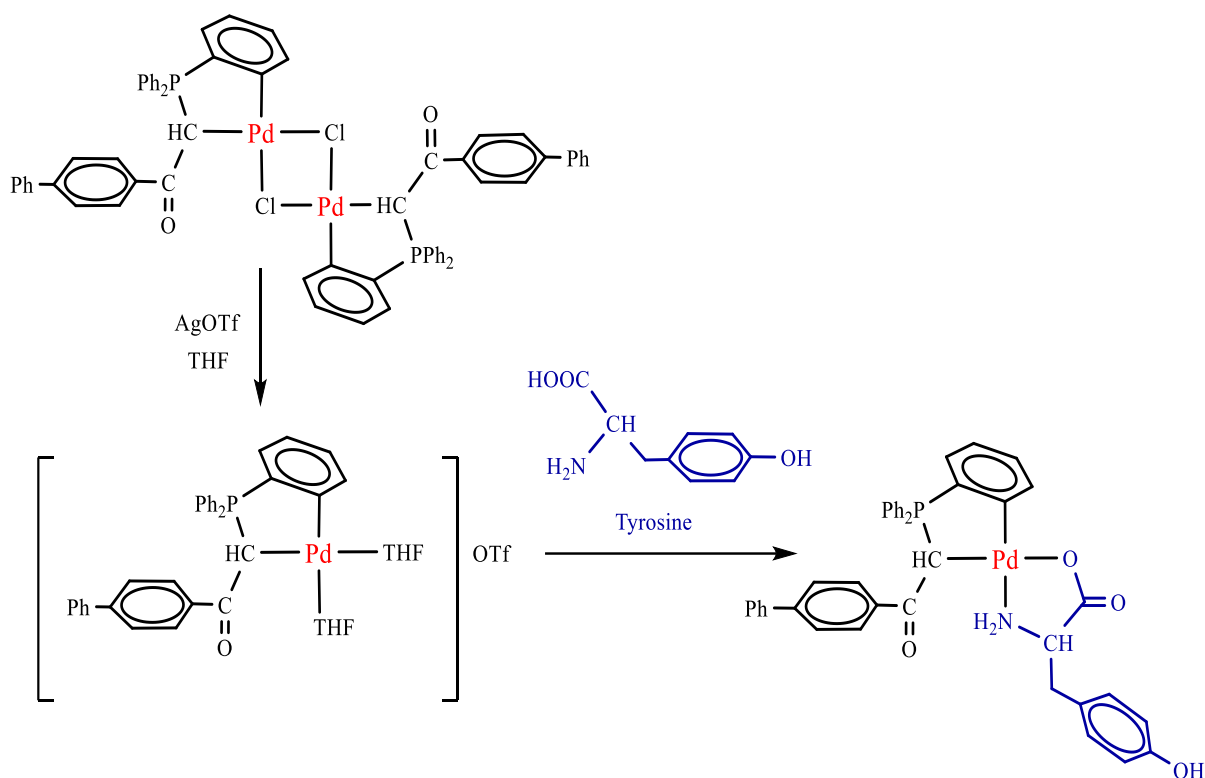
جهت بررسی محل احتمالی اتصال و روشن شدن مکانیسم اتمی اتصال کمپلکس فلزی بر روی پروتئین BSA شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار اتوداک ۴/۲ انجام گرفت [۳۸]. ساختار سه بعدی پروتئین BSA از RCSB protein (3V03) data bank به آدرس (<http://www.rcsb.org>) گرفته شد [۳۹]. ساختمان سه بعدی کمپلکس فلزی توسط نرم افزار ChemDraw21.0.0.28 رسم شد و سپس فرمت pdb آن از طریق سایت (<http://www.cheminfo.org>) openable ایجاد گردید. در این مرحله ساختار مولکولی ایجاد شده توسط نرم افزار HyperChem 8.0.6 بهینه (از نظر انرژی و ممانعت‌های فضایی) شد [۴۰]. با توجه به اینکه اطلاعات خاصی از محل اتصال کمپلکس فلزی بر روی BSA در دسترس نبود، ابتدا یک داکینگ کور (blind docking) انجام شد تا طی فرایند داکینگ تمامی موقعیت‌های احتمالی اتصال پیش بینی شده و امتیاز بندی گردد. در مرحله دوم داکینگ متمرکز انجام شد به این صورت که تنها بخش‌هایی از پروتئین در جعبه (باکس) شبیه‌سازی داکینگ تعریف شد که دارای کمترین میزان انرژی اتصال و به عبارتی بهترین موقعیت‌های اتصال به دست آمده از داکینگ کور (مرحله اول) بودند. بنابراین جعبه‌ای با ابعاد ۱۲۲، ۱۱۶، ۱۲۶ (x, y, Z) با grid spacing ۰/۳۹ آنگستروم ایجاد شد [۴۱].

برنامه LigPlot 2.2.8 جهت بررسی برهمکنش و نرم افزار PyMOL 2.5.5 برای نمایش گرافیکی محل اتصال کمپلکس فلزی استفاده شد.

۳- بحث

۳-۱- سنتز و شناسایی کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی لیگاند تیروزین

در نتیجه رفلکس کمپلکس دوهسته‌ای C^αC-سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید دارای پل کلرید با آمینواسید طبیعی تیروزین به نسبت استوکیومتری ۲:۱، کمپلکس تک هسته‌ای سیکلومتاله پالادیوم (II) حاوی لیگاند تیروزین تشکیل می‌گردد (شکل ۱). کمپلکس تک هسته‌ای سنتز شده، به وسیله روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) و رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) به خوبی مورد شناسایی قرار گرفت.



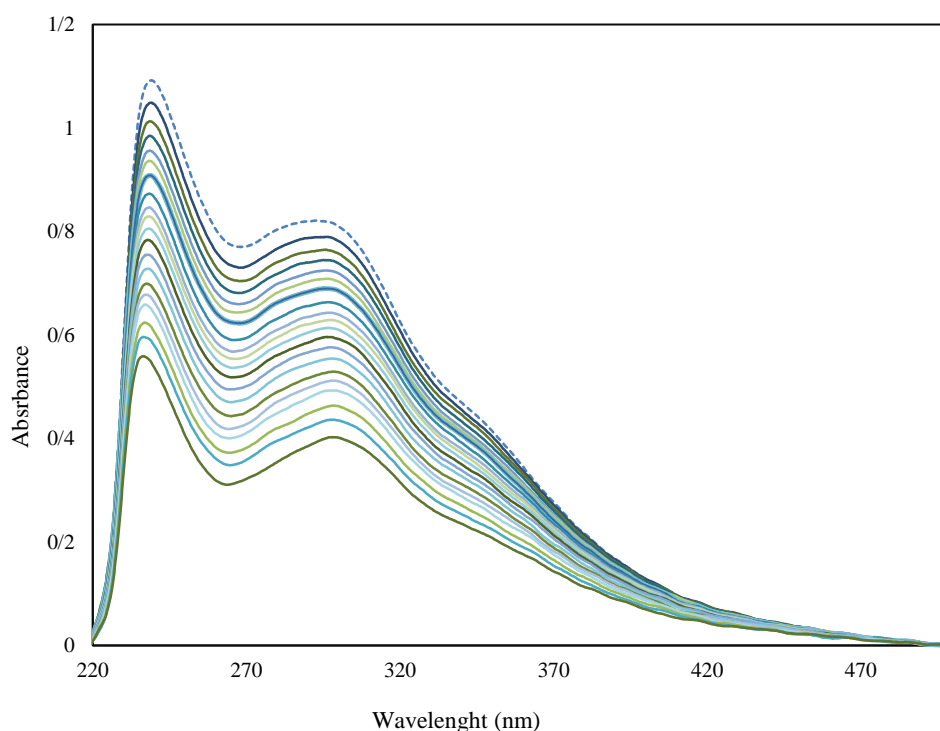
شکل ۱. طرح کلی سنتز کمپلکس تک هسته‌ای سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی لیگاند تیروزین

بر اساس نتایج بدست آمده از طیف‌سنجی مادون قرمز، فرکانس کششی مربوط به گروه آمین و گروه کربونیل آمینواسید در کمپلکس تک هسته‌ای به ترتیب در بازه $3350-3200\text{ cm}^{-1}$ و $1620-1610\text{ cm}^{-1}$ ظاهر می‌شود. طیف $^1\text{H NMR}$ ترکیب سنتز شده، شامل پروتون‌های لیگاند فسفر ایلید و آمینواسید تیروزین می‌باشد. تغییر موقعیت و جابه‌جایی شیمیایی پروتون‌ها در کمپلکس نسبت به لیگاند آزاد ناشی از کوئوردینه شدن لیگاند به یون فلزی است. در طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب، سیگنال‌های مربوط به پروتون گروه‌های متین (CH) و متیلن (CH_2) در آمینواسید به صورت چندتایی در ناحیه $3/50-2/00\text{ ppm}$ و پروتون

ایلیدی در محدوده ناحیه $5/00 \text{ ppm}$ به علت جفت شدن با فسفر به صورت دوتایی ظاهر می شود [۴۲ و ۳۷]. جابه جایی شیمیایی سیگنال پروتون ایلیدی به میدان های پایین تر به علت کوئوردینه شدن ایلید به فلز مرکزی و انتقال بار به سمت یون فلزی می باشد [۳۷ و ۴۲]. در نتیجه کاهش چگالی الکترونی روی حلقه های آروماتیک، پروتون های لیگاند، ناپوشیده و به سمت میدان های پایین تر جابه جا شده اند. در ناحیه $6/5-8/5 \text{ ppm}$ سیگنال های مربوط به پروتون های آروماتیک در لیگاند فسفر ایلید و آمینواسید تیروزین ظاهر گردیده اند.

۳-۲- برهمکنش کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفر ایلید حاوی لیگاند تیروزین با DNA

کمپلکس های فلزی می توانند به محل های متفاوت بر روی رشته های DNA کوئوردینه و باعث تخریب DNA شوند. برهمکنش کمپلکس ها با DNA به دو گروه اصلی برگشت ناپذیر (پیوند کوالانسی) و برگشت پذیر (پیوندهای غیر کوالانسی) تقسیم می شود. برهمکنش های غیر کوالانسی خود به سه دسته الکتروستاتیک، شیاری و اینترکلشن طبقه بندی می شوند. نوع اتصال به رشته های DNA به ویژگی های ساختاری کمپلکس فلزی وابسته می باشد [۴۳]. در این تحقیق، افزایش غلظت DNA منجر به کاهش در جذب (پدیده هیپوکرومیک)، همراه با جابه جایی به سمت طول موج پایین تر (انتقال به آبی) در کمپلکس گردید. با توجه به تحقیقات پیشین [۲۷]، تغییرات مشاهده شده در طیف های جذبی برهمکنش اینترکلشن میان کمپلکس و DNA را نشان می دهد. طیف جذبی کمپلکس در حضور و در غیاب DNA در شکل ۲ نشان داده شده است.

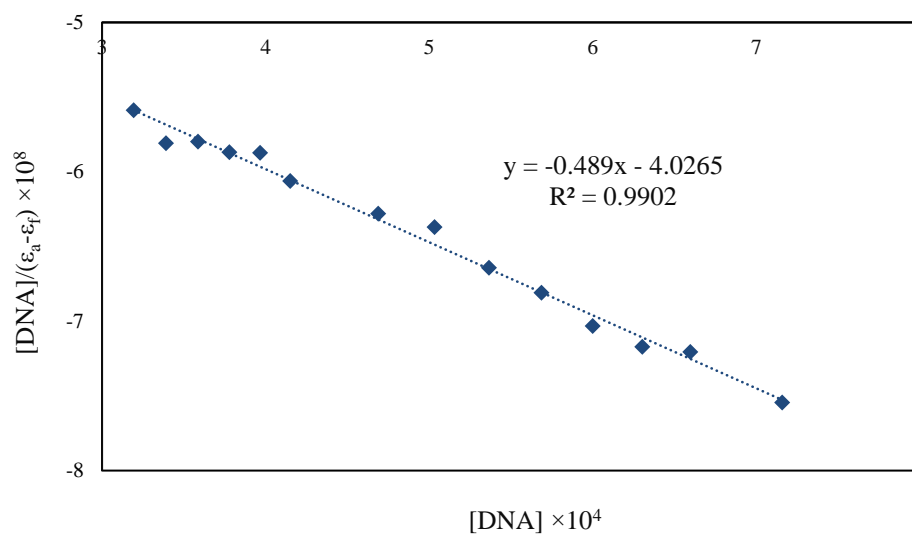


شکل ۲. طیف جذبی کمپلکس با افزایش غلظت DNA

به منظور نشان دادن قدرت برهمکنش کمپلکس با DNA، ثابت پیوند ذاتی (K_b) از طریق معادله ولف (معادله ۱) برای کمپلکس به دست می آید.

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \quad \text{معادله ۱}$$

در معادله فوق، $[DNA]$ عبارت است از غلظت DNA در جفت‌بازها و ϵ_a ، ϵ_b و ϵ_f به ترتیب ضریب جذب متناسب با $A_{obs}/[complex]$ ، ضریب جذب کمپلکس آزاد و ضریب جذب کمپلکس پیوند یافته به DNA می‌باشند. با رسم نمودار $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ در مقابل $[DNA]$ ، مقدار ثابت پیوندی ذاتی کمپلکس K_b از نسبت شیب به عرض از مبدا نمودار معادل با $1/2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ نسبت به $[DNA]$

با استفاده از مقدار ثابت پیوندی ذاتی می‌توان انرژی آزاد گیبس (ΔG) برای اتصال کمپلکس به DNA را به وسیله معادله ۲ به دست آورد.

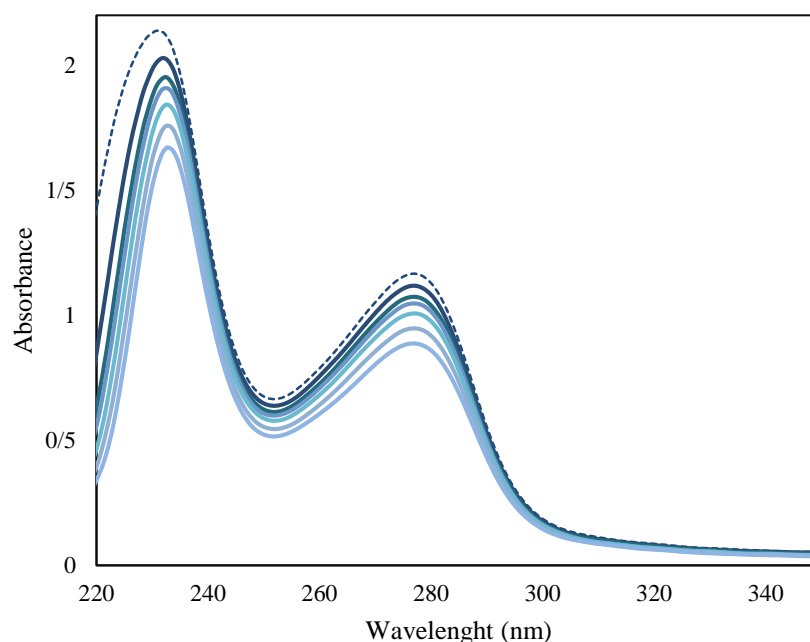
$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{معادله ۲}$$

ثابت پیوندی ذاتی K_b ، مقیاسی برای اندازه‌گیری پایداری اتصال کمپلکس به DNA و انرژی آزاد گیبس، نشان‌دهنده خودبه‌خودی یا غیرخودبه‌خودی بودن برهمکنش کمپلکس با DNA می‌باشد. مقدار ΔG برای کمپلکس برابر با $-4/224$ کیلوکالری بر مول محاسبه گردید که نشان‌دهنده خودبه‌خودی بودن برهمکنش کمپلکس با DNA است.

۳-۳- برهمکنش کمپلکس سیکلومتاله پالادیوم (II) حاوی لیگاند تیروزین با پروتئین BSA

۳-۳-۱- بررسی برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA با استفاده از طیف سنجی UV-Vis

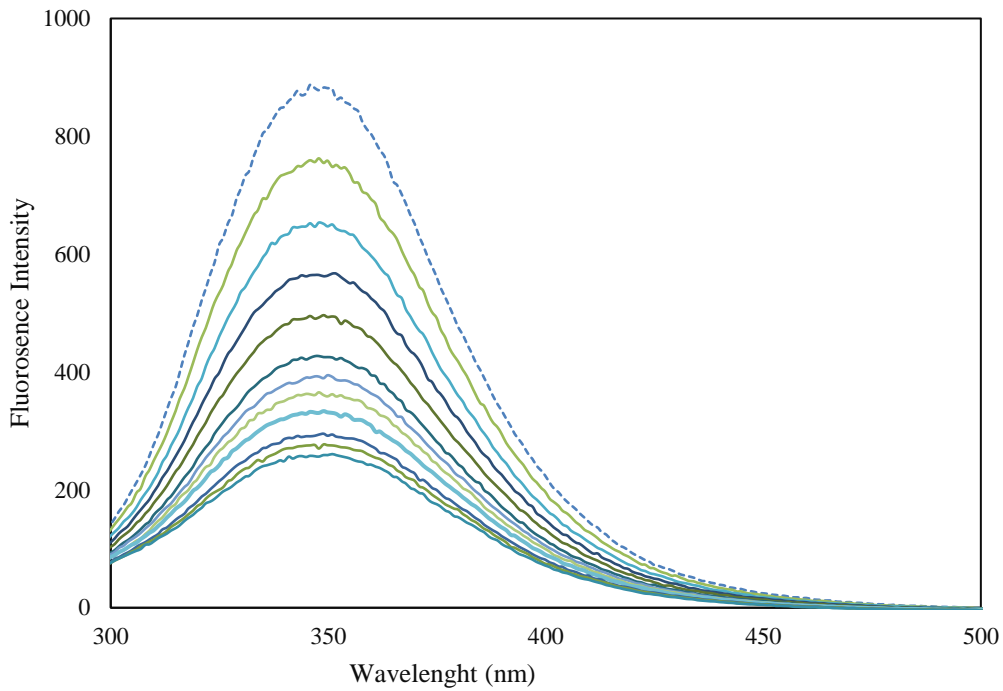
طیف جذب الکترونی پروتئین BSA در غیاب و حضور غلظت‌های متفاوتی از کمپلکس در شکل ۴ نشان داده شده‌است. پروتئین BSA دارای دو نوار جذبی در ناحیه ۲۲۰-۲۴۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر، به ترتیب مربوط به نوار جذبی ساختاری پروتئین BSA و نوار جذبی آمینواسیدهای آروماتیک پروتئین BSA (تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین) است. با افزایش غلظت‌های گوناگون از محلول کمپلکس به محلول BSA با غلظت ثابت، شدت نوار جذبی پروتئین BSA در ۲۲۰-۲۴۰ نانومتر کاهش می‌یابد و طول موج ماکزیمم جذب دچار تغییر می‌شود. هم‌چنین، شدت نوار جذبی پروتئین BSA در ۲۸۰ نانومتر کاهش می‌یابد ولی طول موج ماکزیمم جذب بدون تغییر باقی می‌ماند. تغییر در طیف جذب الکترونی BSA در اثر افزایش کمپلکس، نشان از تغییر در صورت‌بندی پروتئین BSA و هم‌چنین تغییر در قطبیت ریزمحیط‌های اطراف آمینواسیدهای پروتئین BSA دارد که ناشی از برهمکنش بین پروتئین BSA و کمپلکس می‌باشد.



شکل ۴. طیف جذبی پروتئین BSA با افزایش غلظت کمپلکس

۳-۳-۲- بررسی برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA با استفاده از طیف سنجی نشری فلورئورسانس

طیف فلورئورسانس پروتئین BSA دارای یک نشر قوی در ناحیه ۳۳۹ نانومتر می‌باشد. با توجه به میزان تغییر در شدت نشر طیف BSA در اثر افزایش کمپلکس، می‌توان به نوع مکانیسم و برهمکنش بین کمپلکس و پروتئین BSA پی برد (شکل ۵).



شکل ۵. طیف نشری BSA با افزایش غلظت کمپلکس

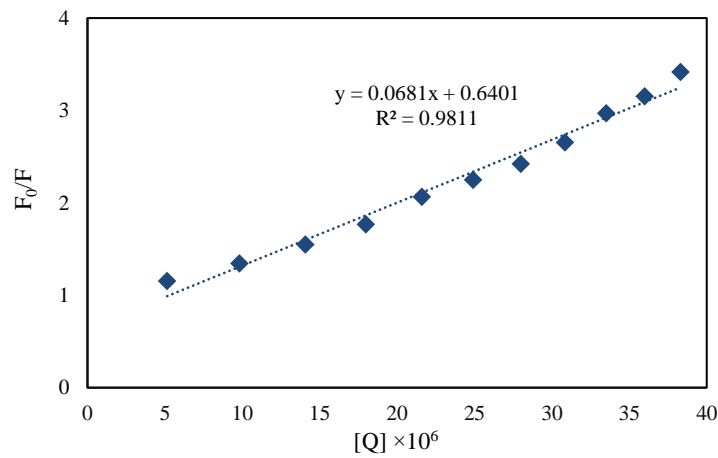
با استفاده از معادله خطی اشترن-والمر، مقدار ثابت خاموش سازی اشترن-والمر (K_{sv}) با استفاده از معادله ۳ به دست می آید.

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{معادله ۳}$$

در این معادله، F_0 و F به ترتیب، شدت نشر فلورئورسانس قبل و بعد از اضافه شدن کمپلکس (خاموش ساز)، $[Q]$ غلظت کمپلکس

(خاموش ساز) و K_{sv} مقدار ثابت خاموش سازی خطی اشترن-والمر می باشد. مقدار K_{sv} برابر با $6/8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ و نشان دهنده

برهمکنش کمپلکس با BSA می باشد (شکل ۶).



شکل ۶. نمودار F_0/F نسبت به $[Q]$

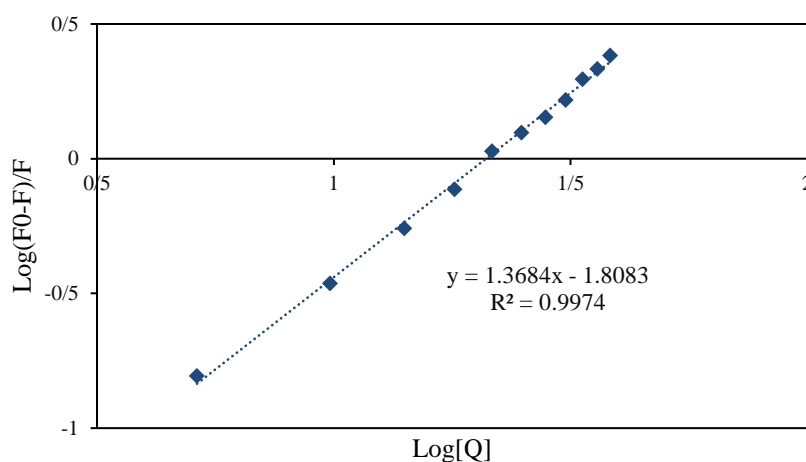
k_q ، مقدار ثابت سرعت خاموش سازی مولکول های زیستی است که با استفاده از معادله ۴ بدست می آید. در این معادله، τ_0 ، طول عمر متوسط مولکول های زیستی است که مقدار آن برای پلیمرهای زیستی برابر با 10^{-8} ثانیه می باشد.

$$k_q = K_{sv}/\tau_0 \quad \text{معادله ۴}$$

با استفاده از معادله ۴، مقدار k_q برای کمپلکس برابر با $6/8 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ به دست آمد. با توجه به این که مقدار ثابت سرعت خاموش سازی مولکول های زیستی با مکانیسم دینامیک برابر با $10^{-8} M^{-1}s^{-1} \times 2$ است، به دست آمدن مقادیر بزرگ تر از این مقدار نشان دهنده این است که مکانیسم برهمکنش از نوع استاتیک می باشد. هنگامی که ترکیب مورد نظر از طریق مکانیسم استاتیک با پروتئین BSA برهمکنش پیدا می کند، تعادلی میان مولکول آزاد و مولکول متصل شده برقرار می شود که به وسیله معادله اسکچارد (معادله ۵) بررسی می شود.

$$\text{Log } (F_0 - F) / F = \text{Log } K_b + n \text{Log } [Q] \quad \text{معادله ۵}$$

در این معادله K_b مربوط به ثابت پیوندی برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA است و n مربوط به تعداد مکان های پیوند دهنده در مولکول BSA می باشد. با رسم نمودار $\text{Log } [(F_0 - F) / F]$ نسبت به $\text{Log } [Q]$ (شکل ۷)، مقادیر K_b و n به ترتیب با استفاده از شیب نمودار و عرض از مبدا نمودار محاسبه می شوند.



شکل ۷. نمودار $\text{Log } [(F_0 - F) / F]$ نسبت به $\text{Log } [Q]$

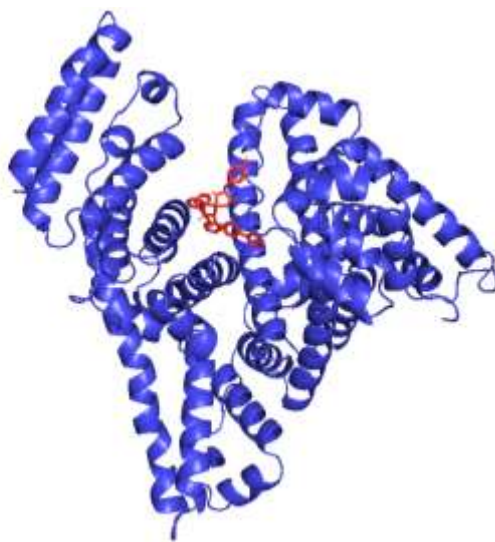
با توجه به نتایج، مشخص می شود که تقریباً یک مکان برهمکنش برای کمپلکس با مولکول BSA وجود دارد ($n=1$). مقدار ثابت پیوندی برای کمپلکس با پروتئین BSA برابر با $1/5 \times 10^4 M^{-1}$ می باشد که این مقدار نشان دهنده برهمکنش خوب کمپلکس با پروتئین BSA است.

در مقایسه با مطالعاتی که پیش از این به وسیله این گروه [۲۷] و همچنین گروه های تحقیقاتی دیگر در این زمینه صورت گرفته است [۴۴-۴۶]، می توان به این نکته اشاره کرد که بدون شک ساختار الکترونی و فضایی کمپلکس اثر مهمی در نوع و

میزان برهمکنش با ماکرومولکول‌های زیستی را ایفا می‌کند [۴۷-۵۰]. به‌عنوان مثال، کمپلکس‌های دارای ساختار هندسی مسطح و یا مسطح انحراف یافته در اغلب موارد با ساختار DNA برهمکنش از نوع اینترکلینیشن برقرار می‌کنند. هم‌چنین، وجود حلقه‌های فنیل یا آریل امکان برقراری پیوند از نوع π - π استکینگ را فراهم می‌آورد که به نوبه خود منجر به تقویت شدت برهمکنش با مولکول زیستی هدف خواهد شد.

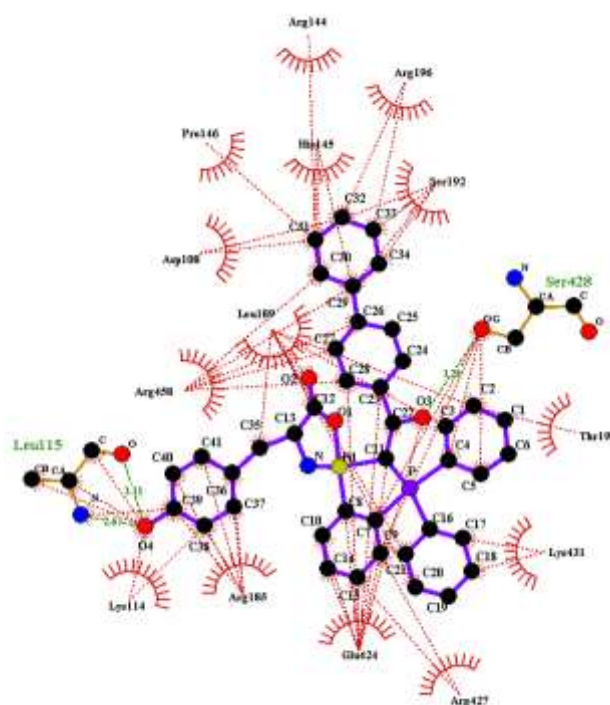
۳-۴- محاسبات داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی به‌عنوان یک روش مهم در شناسایی برهمکنش دارو و مولکول‌های حجیم زیستی به‌کار می‌رود. جهت درک بهتر برهمکنش کمپلکس سنتز شده با پروتئین BSA، در این تحقیق با استفاده از داکینگ مولکولی، صورت‌بندی‌های احتمالی ترکیب کمپلکس-پروتئین BSA مدل‌سازی گردید. انرژی پیوند پایدارترین صورت‌بندی مدل‌سازی شده در حدود ۹/۹۶- کیلوکالری بر مول محاسبه گردید (شکل ۸).



شکل ۸. نتایج داکینگ مولکولی: جهت گیری پایدارترین صورت بندی کمپلکس با پروتئین BSA

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعات داکینگ مولکولی، پیش‌بینی می‌شود پیوند کمپلکس به پروتئین BSA از طریق جایگاه‌های آب‌گریز مستقر بر روی حوزه IB در سایت III صورت پذیرد. نمای نزدیک برهمکنش کمپلکس و پروتئین BSA در شکل ۹ نشان‌دهنده برهمکنش کمپلکس با پروتئین BSA از طریق آمینواسیدهای Asp108, His145, Arg144, Arg196, Pro146, Lys114, Arg185, Glu424, Arg458, Lys431, Ser192, Leu189 و Thr190 می‌باشد. هم‌چنین، میان کمپلکس و پروتئین BSA از طریق آمینواسیدهای Ser428 و Leu115 پیوند هیدروژنی برقرار شده‌است.



شکل ۹. نتایج داکینگ مولکولی: نمایش دوبعدی برهمکنش کمپلکس با آمینواسیدهای پروتئین BSA

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، کمپلکس تک هسته‌ای $C^{\wedge}C$ -سیکلومتاله پالادیوم (II) فسفرایلید حاوی آمینواسید طبیعی تیروزین سنتز و با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی FT-IR و NMR شناسایی شد. در ادامه، برهمکنش کمپلکس تک هسته‌ای سیکلومتاله پالادیوم (II) حاوی لیگاند تیروزین با ماکرومولکول‌های زیستی DNA و پروتئین BSA به وسیله تکنیک‌های طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش UV-Vis و نشر فلئورسانس مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات نشان‌دهنده برهمکنش از نوع اینترکلیشن میان کمپلکس و DNA می‌باشد. نتایج بدست آمده از تکنیک‌های طیف‌سنجی جذب مرئی-فرابنفش UV-Vis و نشر فلئورسانس مؤید برهمکنش قابل توجه میان پروتئین BSA می‌باشد. براساس نتایج حاصل از مطالعات داکینگ مولکولی، کمپلکس با پروتئین BSA به‌طور عمده از طریق جایگاه‌های آب‌گریز مستقر بر روی حوزه IB متعلق به سایت III اتصال می‌یابد.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان از حمایت دانشگاه خوارزمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران و همچنین صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

۶- فهرست منابع و ماخذ

[1] Deo, S. V. S., Sharma, J., & Kumar, S. (2022). GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists. *Annals of Surgical Oncology*, 29(11), 6497-6500.

- [2] Galanski, M., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2005). Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18), 2075-2094.
- [3] Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews*, 107(5), 1387-1407.
- [4] Lee, S. Y., Kim, C. Y., & Nam, T. -G. (2020). Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives. *Drug Design, Development and Therapy*, 5375-5392.
- [5] Muhammad, N., & Guo, Z. (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19, 144-153.
- [6] Mohammadi, N., Abedanzadeh, S., Fereidonnejad, R., Mahdavinia, M., & Fereidoonzhad, M. (2023). Effects of diphosphine ligands on the anticancer behavior of cycloplatinated (II) complexes of 2, 2'-Bipyridine N-Oxide: in vitro cytotoxicity, apoptosis, genotoxicity, and molecular docking studies. *Journal of Organometallic Chemistry*, 122759.
- [7] Fereidoonzhad, M., Shahsavari, H. R., Abedanzadeh, S., Nezafati, A., Khazali, A., Mastroilli, P., Babaghasabha, M., Webb, J., Faghih, Z., Faghih, Z., Bahemmat S., & Beyzavi, M. H. (2018). Synthesis, structural characterization, biological evaluation and molecular docking studies of new platinum (ii) complexes containing isocyanides. *New Journal of Chemistry*, 42(11), 8681-8692.
- [8] Sakamaki, Y., Ahmadi Mirsadeghi, H., Fereidoonzhad, M., Mirzaei, F., Moghimi Dehkordi, Z., Chamyani, S., Alshami, M., Abedanzadeh, S., Shahsavari, H. R. & Beyzavi, M. H. (2019). trans-platinum (II) thionate complexes: synthesis, structural characterization, and in vitro biological assessment as potent anticancer agents. *ChemPlusChem*, 84(10), 1525-1535.
- [9] Carneiro, T. J., Martins, A. S., Marques, M. P. M. & Gil, A. M. (2020). Metabolic aspects of palladium (II) potential anti-cancer drugs. *Frontiers in Oncology*, 10, 590970.
- [10] Lazarević, T., Rilak, A., & Bugarčić, Ž. D. (2017). Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 8-31.
- [11] Vojtek, M., Marques, M. P. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Mota-Filipe, H., & Diniz, C. (2019). Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. *Drug Discovery Today*, 24(4), 1044-1058.
- [12] Kapdi, A. R., & Fairlamb, I. J. (2014). Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chemical Society Reviews*, 43(13), 4751-4777.
- [13] Karami, K., Abedanzadeh, S., Yadollahi, F., Büyükgüngör, O., Farrokhpour, H., Rizzoli, C., & Lipkowski, J. (2015). Mono-and binuclear orthopalladated complexes of phosphorus ylides containing nitrogen, phosphorus or bridging diphosphine ligands: Self-assembly, theoretical calculations and comparative catalytic activity. *Journal of Organometallic Chemistry*, 781, 35-46.
- [14] Jamali, S., Abedanzadeh, S., Khaledi, N. K., Samouei, H., Hendi, Z., Zacchini, S., Kia, R., &

- Shahsavari, H. R. (2016). A cooperative pathway for water activation using a bimetallic Pt 0–Cu I system. *Dalton Transactions*, 45(44), 17644-17651.
- [15] Karami, K., Abedanzadeh, S., Farrokhpour, H., & Lipkowski, J. (2016). Synthesis and characterization of the P, C-palladacycles with bridging and chelating dinitrogen ligands and ONIOM calculations on the pyrazine-bridged organometallic polymers (n= 1 to n= 10). *Journal of Organometallic Chemistry*, 805, 68-76.
- [16] Shahsavari, H. R., Lalinde, E., Moreno, M. T., Niazi, M., Kazemi, S. H., Abedanzadeh, S., Barazandeh, M., & Halvagar, M. R. (2019). Half-lantern cyclometalated Pt (ii) and Pt (iii) complexes with bridging heterocyclic thiolate ligands: synthesis, structural characterization, and electrochemical and photophysical properties. *New Journal of Chemistry*, 43(20), 7716-7724.
- [17] Beletskaya, I. P., & Cheprakov, A. V. (2004). Palladacycles in catalysis– a critical survey. *Journal of Organometallic Chemistry*, 689(24), 4055-4082.
- [18] Dupont, J., Consorti, C. S., & Spencer, J. (2005). The potential of palladacycles: more than just precatalysts. *Chemical Reviews*, 105(6), 2527-2572.
- [19] Herrmann, W. A., Öfele, K., Preysing, D. v., & Schneider S. K. (2003). Phospha-palladacycles and N-heterocyclic carbene palladium complexes: efficient catalysts for CC-coupling reactions. *Journal of Organometallic Chemistry*, 687(2), 229-248.
- [20] Karami, K., Abedanzadeh, S., & Hervés, P. (2016). Synthesis and characterization of functionalized titania-supported Pd catalyst deriving from new orthopalladated complex of benzophenone imine: catalytic activity in the copper-free Sonogashira cross-coupling reactions at low palladium loadings. *RSC Advances*, 6(96), 93660-93672.
- [21] Jamali, S., & Abedanzadeh, S. (2018). Organoplatinum (II) complexes containing bis-(N-heterocyclic carbene) ligands: Catalytic activity in hydrosilylation of α , β -unsaturated ketones. *Applied Chemistry*, 13(46), 295-310. (in Persian)
- [22] Karami, K., Esfarjani, S., Abedanzadeh, S., & Lipkowski, J. (2014). P, C-palladacycle complexes of triphenylphosphite: Synthesis, characterization and catalytic activity in the Suzuki cross-coupling reaction. *Polyhedron*, 68, 249-257.
- [23] Alonso, D. A., & Najera, C. (2010). Oxime-derived palladacycles as source of palladium nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 2891-2902.
- [24] Karami, K., Abedanzadeh, S., Vahidnia, O., Herves, P., Lipkowski, J., & Lyczko, K. (2017). Orthopalladated complexes of phosphorus ylide: Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone)-stabilized palladium nanoparticles as reusable heterogeneous catalyst for Suzuki and Heck cross-coupling reactions. *Applied Organometallic Chemistry*, 31(11), e3768.
- [25] Jain, V.K. (2021). Cyclometalated group-16 compounds of palladium and platinum: Challenges and opportunities. *Coordination Chemistry Reviews*, 427, 213546.
- [26] Cutillas, N., Yellol, G. S., de Haro, C., Vicente, C., Rodríguez, V., & Ruiz, J. (2013). Anticancer

- cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(19-20), 2784-2797.
- [27] Abedanzadeh, S., Karami, K., Rahimi, M., Edalati M., Abedanzadeh, M., Tamaddon, A. M., Dehdashti Jahromi M., Amirghofran, Z., Lipkowskif J., & Lyczkog K. (2020). Potent cyclometallated Pd (II) antitumor complexes bearing α -amino acids: synthesis, structural characterization, DNA/BSA binding, cytotoxicity and molecular dynamics simulation. *Dalton Transactions*, 49(42), 14891-14907.
- [28] Rúa-Sueiro, M., Munín-Cruz, P., Fernández, A., Ortigueira, J. M., Pereira, M. T., & Vila, J. M. (2022). Cyclometallated palladium (II) complexes: An approach to the first dinuclear bis (iminophosphorane) phosphane-[C, N, S] metallacycle. *Molecules*, 27(20), 7043.
- [29] Geyl, K. K., Baykov, S. V., Kasatkina, S. O., Savko, P. Y., & Boyarskiy, V. P. (2022). Reaction of coordinated isocyanides with substituted N-(2-pyridyl) ureas as a route to new cyclometallated Pd (II) complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*, 980, 122518.
- [30] Albrecht, A. (2010). Cyclometalation using d-block transition metals: fundamental aspects and recent trends. *Chemical Review*, 110(2), 576-623
- [31] Urriolabeitia, E. P., (2010). Ylide ligands. Transition metal complexes of neutral metal-carbon ligands (Vol. 30), 15-48.
- [32] Liu, H. -K., & Sadler P., (2011). Metal complexes as DNA intercalators. *Accounts of Chemical Research*, 44(5), 349-359.
- [33] Komora, A. C., & Barton, J. K. (2013). The path for metal complexes to a DNA target. *Chemical Communication*, 49, 3617-3630.
- [34] Bruijninx, P. C., & Sadler, P. J. (2008). New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 197-206.
- [35] Sudlow, G., Birkett, D., & Wade, D. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 11(6), 824-832.
- [36] Scattolin, T., Voloshkin, V. A., Visentin, F., & Nolan, S. P. (2021). A critical review of palladium organometallic anticancer agents. *Cell Reports Physical Science*, 2(6), 100446.
- [37] Karami, K., Rizzoli, C., & Borzooie, F. (2011). Orthopalladation of phosphorus ylides in endo position with bidentate ligands. *Polyhedron*, 30(5), 778-784.
- [38] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- [39] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H. I., Shindyalov, N., & Bourne, P. E. (2006). The protein data bank, 1999-.
- [40] Froimowitz, M. (1993). HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques*, 14(6), 1010-1013.
- [41] Wolber, G., Dornhofer, A. A., & Langer, T. (2006). Efficient overlay of small organic molecules

- using 3D pharmacophores. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(12), 773-788.
- [42] Aguilar, D., Aragüés, M. A., Bielsa, R., Serrano, E., Soler, T., Navarro, R., & Urriolabeitia, E. P. (2008). Synthesis and structure of orthopalladated complexes derived from prochiral iminophosphoranes and phosphorus ylides. *Journal of Organometallic Chemistry*, 693(3), 417-424.
- [43] Boerner, L. J. K., & Zaleski, J. M. (2005). Metal complex–DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 135-144.
- [44] Jurgens, S., Kuhn, F. E., & Casini, A. (2018). Cyclometalated complexes of platinum and gold with biological properties: state-of-the-art and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 25(4), 437-461.
- [45] Sindhu, M., Kalaivani, P., & Prabhakaran, R. (2022). Enhanced anticancer property of bio-organometallic nano composites: Design, characterization, and biological evaluation. *Applied Organometallic Chemistry*, 36(1), e6488.
- [46] Khater, M., Brazier, J. A., Greco, F., & Osborn, H. M. (2023). Anticancer evaluation of new organometallic ruthenium (II) flavone complexes. *RSC Medicinal Chemistry*, 14(2), 253-267.
- [47] Omae, I. (2014). Applications of five-membered ring products of cyclometalation reactions as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 280, 84-95.
- [48] Liu, H. K., & Sadler, P. J. (2011). Metal complexes as DNA intercalators. *Accounts of Chemical Research*, 44(5), 349-359.
- [49] Habibi Shabestary, B., & Golbon Haghghi, M. (2023). Synthesis, Characterization and DNA binding studies of Platinum Complexes with Imine Ferrocene Ligand. *Applied Chemistry*, 18(66), 225-240. (in Persian)
- [50] Movahedi, E., Razmazma, H., Rezvani, A., & Nowroozi, A., (2021). Synthesis, characterization, and evaluation of the interaction of DNA with a new silver(I) complex with diazafluorene-based ligands: Experimental and theoretical studies. *Applied Chemistry*, 16(59), 32-50. (in Persian)

