طراحی، سنتز و برهمکنش DNA با کمپلکس پالادیوم فندایون سارکوزین

حسین فرهنگیان

پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران

E-mail: Farhangian@ccerci.ac.ir

چکیده

تحقیق حاضر به منظور طراحی و تولید مشتق جدیدی از داروهای ضد سرطان با سمیت و عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای کلینیکی پلاتین در درمان سرطان، صورت گرفته است. در این تحقیق، برهمکنش DNA با کمپلکس ضد سرطان جدید پالادیوم (II) با فرمول $[Pd(phd)(sarcosine)]NO_3$ مورد بررسی قرار گرفته است. در فرمول، phd به معنای ۱ و ۱۰-فنانترولین-۵ و ۶-دی ان می‌باشد. این کمپلکس دارای این توانایی است که در غلظت میلی مولار، DNA را تخریب کند و این توانایی با افزایش دما، بهبود می‌یابد. همچنین، با تعیین پارامترهای ترمودینامیکی در این برهمکنش، مکانیسم احتمالی و نحوه تغییر کانفورماسیون DNA پیش‌بینی شده است.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس پالادیوم(II) ، DNA، فندایون، سارکوزین، ضد سرطان

۱- مقدمه

تحقیقات جدید در زمینه داروشناسی سرطان بهبود قابل توجهی در درک عملکرد داروهایی که با پروتئین یا DNA پیوند می‌زنند، داشته و فعالیت این داروها را در ارتباط با اثرات ژنتیکی نیز بررسی می‌کند. برخی از داروهای ضد سرطان از طریق تعامل مستقیم با DNA، از گسترش سرطان جلوگیری می‌کنند. بنابراین، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه برهمکنش داروها با DNA صورت گرفته است[1,2].

در حال حاضر، سیس پلاتین و کربوپلاتین دو داروی مهم از خانواده داروهای ضد سرطان، به عنوان داروهای پلاتینی محسوب می‌شوند. این داروها با DNA سلول تعامل داشته و باعث تداخل در رونویسی آن می‌شوند. علاوه بر خصوصیات ضد سرطانی، این داروها دارای عوارض جانبی مختلفی هستند که شامل نوتروپنی (کاهش تعداد نوتروفیل‌ها در خون)، ترومبوسیتوپنی (کاهش تعداد پلاکت‌ها در خون)، کم خونی، تهوع، استفراغ، اسیب شنوایی، اسیب کلیه، خستگی و ریزش مو می‌شوند[3,4].

به علت عوارض جانبی ناخواسته که داروهای موجود در خانواده پلاتین مانند سیس پلاتین و کربوپلاتین دارند، تلاش‌های فراوانی برای سنتز و شناسایی کمپلکس‌های جدید با خصوصیات ضد سرطانی و عوارض جانبی کمتر انجام شده است. به عنوان مثال، برخی از کمپلکس‌های پلاتین و پالادیوم که همراه با آمینو اسیدها سنتز شده‌اند، به عنوان عوامل ضد سرطان شناسایی شده‌اند. این کمپلکس‌های جدید امیدوارکننده هستند زیرا ممکن است خصوصیات ضد سرطانی مشابه یا بهتری نسبت به داروهای قبلی داشته باشند و در عین حال دارای عوارض جانبی کمتری باشند[5].

با کشف فعالیت ضد سرطانی سیس پلاتین و عدم فعالیت ترانس پلاتین، و همچنین با توجه به عوارض جانبی نامطلوب که ممکن است در اثر استفاده از سیس پلاتین ایجاد شوند، تمرکز تحقیقات بعدی بر روی توسعه کمپلکس‌های ضد تومور قرار گرفت. هدف اصلی این تحقیقات این بود که کمپلکس‌های جدیدی تولید شود که علاوه بر فعالیت ضد سرطانی مطلوب، بتوانند بر روی انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی تأثیر گذاشته و همچنین عوارض جانبی مرتبط با سیس پلاتین را به حداقل برسانند. این تلاش‌ها به منظور یافتن داروهای ضد سرطانی با کارایی بیشتر و همچنین کاهش عوارض جانبی ناخواسته و پیامدهای سوء مرتبط با درمان سرطان صورت گرفته است.

۱-۱- پالادیوم در جایگاه پلاتین

کمپلکس‌های پلاتین (II) از نظر سینتیکی و ترمودینامیکی پایدارتر از کمپلکس‌های پالادیوم (II) هستند. با این حال، پالادیوم در واکنش‌های جایگزینی، به ویژه با لیگاندهایی که عملکرد سریع‌تری دارند نسبت به کمپلکس‌های پلاتین، بهتر عمل می‌کند. این ویژگی می‌تواند منجر به سنتز بهینه‌تر کمپلکس‌های پالادیوم شود که ممکن است با پلاتین واکنش ندهد. به علاوه، کمپلکس‌های پالادیوم در مقایسه با کمپلکس‌های پلاتین، فعالیت ضدتوموری کمتر و سمیت بالاتری دارند.

محدودیت‌های استفاده از کمپلکس‌های پالادیوم در داروسازی، به خاطر فعالیت کمتر ضدتوموری و سمیت بالای آنها نسبت به کمپلکس‌های پلاتینی مشخص شده است. استفاده اصلی از پالادیوم به عنوان ایزوتوپ ^{103}Pd در درمان سرطان پیشرفته پروستات بوده است. با این وجود، ویژگی‌های نرم بودن و توانایی در فعالیت با لیگاندهای S و N باعث می‌شود که پالادیوم به عنوان گزینه مناسبی از فلزات دیگر در نظر گرفته شود. این ترکیبات، قابلیت خوبی برای پیوند با DNA را دارند و در عین حال، از نظر سینتیکی بسیار کم‌فعال هستند. به‌علاوه، فلزاتی مانند Ni(II)، Zn(II)، Cu(II) و ... پایداری ترمودینامیکی موردنیاز برای این نوع واکنش را ندارند[3,4] . به این ترتیب، پالادیوم (II) به عنوان

یکی از فلزات جایگزین برای داروهای ضد سرطان پلاتین مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت.

۱-۲- کمپلکس های پالادیوم با لیگاندهای دارای حلقه آروماتیک

اگرچه ترکیب‌های آلی فلزی برای سیستم‌های زیستی به عنوان عوامل سمی شناخته می‌شوند، در حال حاضر داروهایی که بر پایه فلزات ساخته می‌شوند، به اهمیت بیشتری در درمان‌ها دست یافته‌اند. افزودن یون‌های فلزی به درون مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسیدها، یک حوزه گسترده از تحقیقات را شکل داده است. بنابراین استفاده از ترکیب‌های آلی فلزی واسطه در داروسازی بسیار پررنگ است.

در سال‌های اخیر، تعداد زیادی دارو به دلیل فعالیت‌های درمانی گسترده‌ای که دارند، معرفی شده‌اند، اما فقط چند دارو وارد چرخه پزشکی شده‌اند. تجربه نشان داده است که تغییرات کوچک در ساختار داروها، به طریق چشمگیری می‌توانند خواص درمانی آن‌ها را تغییر دهند. آشکار است که لیگاندهای آلی فلزی فرصت‌هایی را ارائه می‌دهند که با داروهای معدنی سنتی به دست نمی‌آیند. این لیگاندها می‌توانند تغییرات و بهبودهای ساختاری را در داروها ایجاد کنند که به دست آوردن این امکانات با داروهای معدنی سنتی غیرممکن است[6].

تحقیقات نشان می‌دهد اگر گروه NH_3 در سیس پلاتین و ترکیبات مشابه ان با آمین های نوع اول (خصوصا حلقوی وآروماتیک) جایگزین شود، منتهی به تهیه داروهای ضد سرطانی با عوارض جانبی کمتر می شود [6,7]. به این ترتیب کمپلکس های فلزی با لیگاندهای آروماتیک چنددندانه با کئوردیناسیون مسطح مربعی N_4 یا N_2O_2 ، بیشتر برای برهمکنش با DNA مطالعه می شود [8-10]. از انواع این ترکیبات کمپلکس های حاوی لیگاندهای دودندانه نیتروژن از جمله ۱و۱۰ فنانترولین به عنوان برش دهنده (cleavage) رشته های DNA و غیر رادیواکتیو است [11]. همچنین کمپلکسهای پالادیوم با لیگاندهای دارای اتم N از جمله پیریدن، کوئینولین و پیرازول نیز سنتز و مشخص شده است که دارای خصلت انتی توموری هستند [12-14]. این ترکیبات علاوه بر کاربرد در طراحی حسگرهای شیمیایی دارای فعالیت بیولوژیکی از قبیل بازدارنده ویروس HIV-1 [15,16] ضد باکتری [17]، ضد مالاریا [18] و ضد توموری بوده[19,20] و به همین دلیل گزینه مناسبی در سنتز و برهمکنش کمپلکس های ضدتوموری می باشد.

بنابراین کمپلکس‌های با لیگاندهای آروماتیک مانند فنانترولین یا بی‌پیریدین و سایر لیگاندهایی که دارای خواص ضد سرطانی هستند، مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته‌اند. برای افزایش قابلیت عبور از غشای سلول و سازگاری بیشتر با سیستم فیزیولوژی، از اسیدهای آمینه به عنوان لیگاند N و O دهنده استفاده می‌شود. این اسیدهای آمینه، نیتروژن و اکسیژن یا گروه کربوکسیلات را به صورت پل به یون‌های فلزی متصل می‌کنند.

در اثر کئوردینه شدن اسیدهای آمینه به صورت کیلیت، باعث می‌شود دو جایگاه کلر در سیس پلاتین غیرفعال یا بلوکه شوند. این اقدام ممکن است منجر به کاهش عوارض جانبی شود. همچنین، در برخی از کمپلکس‌های پالادیوم و پلاتین با استفاده از اسیدهای آمینه، خصوصیت ضد توموری مشاهده شده است، به عنوان مثال بر روی سلول سرطانی لنفوسیت P388 اثر کمپلکس $[Pd(phen)(Tyr)]^+$ گزارش شده است [21].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

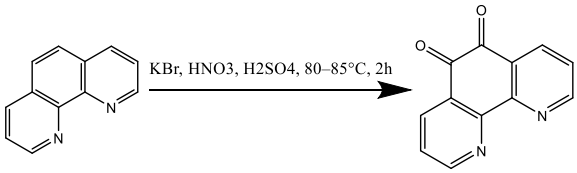
مواد واکنش شامل ۱و۱۰- فنانترولین مونوهیدرات، پتاسم برماید، پالادیوم کلراید، نیترات نقره و DNA از سیگما الدریچ

و سایر مواد و حلال‌ها از شرکت امرتات شیمی تهیه شده است.

۲-۲- سنتز مواد اولیه و کمپلکس

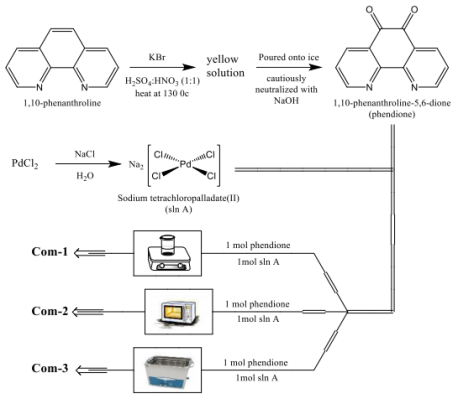
۲-۲-۱- سنتز لیگاند ۱و۱۰ فنانترولین-۵و۶-دی ان

به یک بالون دو دهانه ۱۰۰ میلی لیتری مخلوطی از ۴ گرم ۱و۱۰-فنانترولین مونوهیدرات و ۴ گرم پتاسیم برمید اضافه می‌کنیم سپس مخلوط سردی از ۴۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۲۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ را به صورت قطره قطره به محتویات بالون اضافه می‌کنیم بالون باید در حمام یخ قرار داشته باشد دود نارنجی برم از ظرف واکنش متصاعد می‌شود. پس از اتمام افزودن مخلوط اسیدها بالون را در دمای ۹۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد و برای مدت ۳ ساعت تحت ریفلاکس قرار می‌دهیم. سپس واکنش را برای مدت ۱ ساعت دیگر بدون کندانسور ادامه می دهیم تا دیگر گاز برم خارج نشود. پس از این مرحله اجازه می‌دهیم تا مخلوط واکنش خنک شود. و محتویات بالون را به مخلوط ۴۰۰ میلی لیتر اب و یخ تقطیر شده می‌افزاییم و pH آن توسط محلول سود به ۴ تا ۵ می‌رسانیم و توسط دی کلرومتان استخراج می‌کنیم پس از تبخیر حلال فندایون با راندمان ۹۶ درصد به دست می‌اید. جهت افزایش خلوص محصول حاصل در اتانل کریستال گیری مجدد شد.



۲-۲-۲- سنتز کمپلکس دی کلرو(۱و۱۰ فنانترولین-۵و۶-دی ان) پالادیوم (II)

به ۳ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، ۱۷,۷میلی گرم (۰,۱میلی مول) پالادیوم (II) کلرید و ۲۹,۳ میلی گرم (۰,۵ میلی مول) سدیم کلرید اضافه گردید. سپس مخلوط در ۵۰ درجه سانتیگراد هم زده شد تا کاملاً شفاف شد. سپس سرد و صاف شد. محلول حاوی $Na_2[PdCl_4]$ است. به این محلول، قطره قطره محلول حاوی ۲۱ میلی گرم ۱و۱۰ فنانترولین-۵و۶-دی ان (۰,۱ میلی‌مول) حل شده در ۲ میلی لیتر اتانول تقطیر شده در دمای اتاق افزوده و به مدت یک ساعت هم زده شد. رسوبهای زرد آجری حاصل تحت خلاء صاف و با مقدار زیادی آب دو بار تقطیر و ۵ میلی لیتر اتانول و ۵ میلی لیتر اتر شستشو داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد خشک گردید. مقدار محصول ۳۲ میلی گرم و بازده واکنش ۹۰٪ است. دمای تجزیه این کمپلکس ۳۷۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید.



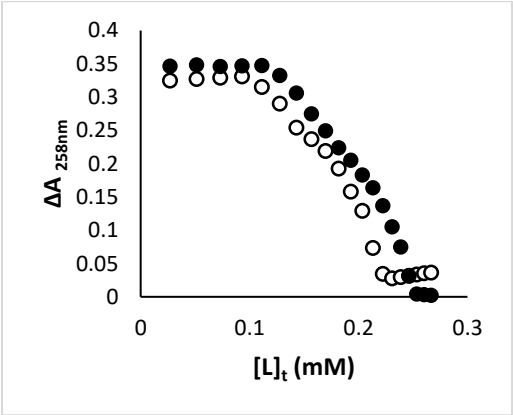
۲-۲-۳- سنتز کمپلکس سارکوزین پالادیوم فندایون نیترات

در یک بالون ۵۰ میلی لیتری مقدار یک میلی مول سارکوزین، یک میلی مول فندایون پالادیوم کلراید، دو میلی مول نیترات نقره و ۳۵ میلی لیتر آب مقطر می‌ریزیم و بالون را برای مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حرارت می‌دهیم. پس از این مدت رسوب AgCl را فیلتر می‌کنیم و حلال را توسط خلا حذف می‌کنیم. رسوب حاصل را توسط استون شستشو داده و در آون خشک می‌کنیم. راندمان واکنش ۷۸ درصد می‌باشد. طیف HNMR در حلال DMSO گرفته شد.

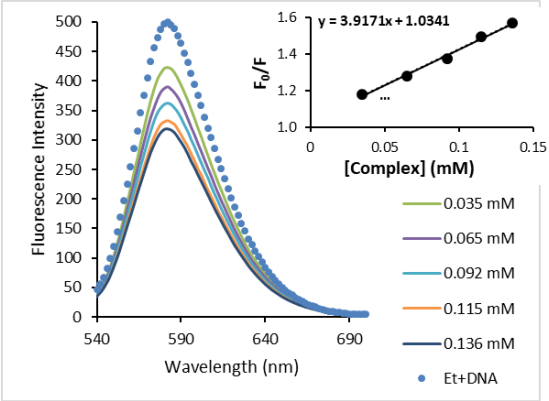
۲-۳- روش آزمایش

برهمکنش کمپلکس و DNA

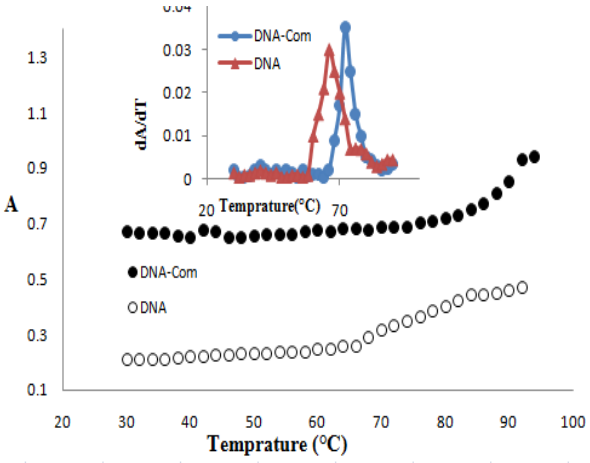
مطالعه غیر طبیعی شدن DNA با کمپلکس تهیه شده در محیط تریس بافر با pH=7.4 و 10 mM سدیم کلرید در دو دمای 27°C و 37°C با استفاده از طیف سنجی UV-visible, Fluorescence انجام و پارامترهای ترمودینامیکی این برهمکنش بررسی شد. شکل ۱ تغییرات جذب DNA در ۲۵۸ نانومتر با افزایش کمپلکس در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط تریس بافر را نشان می دهد که در آن دناتور شدن DNA قابل مشاهده می‌باشد. همچنین شکل ۲ کاهش شدت نشر فلورسانس با افزایش کمپلکس به محلول DNA-EtBr در دمای 27°C در محیط تریس بافر با pH=7.4 را نشان می‌دهد که این امر به واسطه خروج اتیدیوم برمید و قرار گرفتن کمپلکس به جای آن می‌باشد. شکل ۳ برهمکنش بین کمپلکس و DNA در دمای انتقال را نشان می‌دهد. در صورت وجود برهم‌کنش بین کمپلکس و DNA، در دمای انتقال محلول Complex-DNA نسبت به دمای انتقال محلول DNA تنها، تغییر ایجاد می‌شود به طوریکه پایداری حرارتی آن افزایش می‌یابد، که اگر این افزایش بین ۵ تا ۱۲ درجه سانتیگراد باشد نشانه برهم‌کنش از نوع اینترکلیشن است [22]. این میزان برای این برهمکنش ۸ درجه سانتیگراد بدست آمده است که نشان از بر همکنش از نوع اینترکلیت می‌باشد.



شکل ۱- تغییرات جذب DNA با افزایش کمپلکس در دو دمای ۲۷ و ۳۷ درجه سانتی گراد و محیط تریس بافر با pH=7.4



شکل۲- طیف نشر فلوئورسانس برای برهم‌کنش EtBr-DNA در عدم حضور (نقطه چین) و حضور غلظت های متفاوت کمپلکس



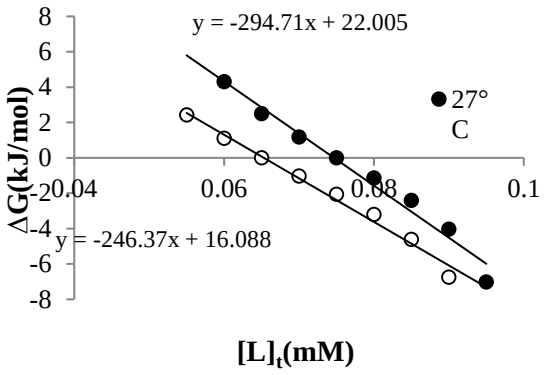
شکل ۳- منحنی ذوب DNA در غیاب و حضور کمپلکس

۳- شرح و بحث

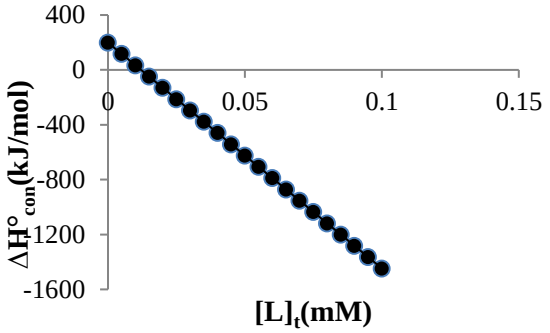
با رسم منحنی تغییرات جذب به غلظت کمپلکس، منحنی دناتور رسم گردید (شکل۱). مطالعه غیر طبیعی شدن DNA با کمپلکس تهیه شده، نشان داد که این ترکیب می‌تواند DNA را در غلظت های میکرومولار دناتور کند. مقادیر $[L]_{1/2}$ در دو دمای 27°C و 37°C به ترتیب (۸۰ و ۷۰) میکرومولار است که با افزایش دما این غلظت کاهش می‌یابد.

با استفاده از منحنی فوق و روش PACE [23] میزان پایداری DNA (ΔG°_{H2O}) در دو دمای 27°C و 37°C به ترتیب (۳۳,۶ و ۲۷,۳ kJ/mol) می باشد. بنابراین DNA در دمای 37°C پایداری کمتری دارد و این پایداری در حضور کمپلکس کاهش می‌یابد. شکل ۴ تغییرات انرژی آزاد گیبس

برای DNA در دو دمای 27°C و 37°C را نشان می دهد. همچنین شکل ۵ نمودار تغییرات انتالپی DNA در برابر کمپلکس را نشان می دهد.



شکل ۴- تغییرات انرژی گیبس DNA با افزایش لیگاند در دو دمای 27°C و37°C



شکل ۵- نمودار تغییرات آنتاپی DNA در برابر $[L]_t$ مربوط به برهم‌کنش DNA با کمپلکس

همچنین با بکارگیری وانت هوف می توان $\Delta H^\circ_{conformation}$ یا $\Delta H^\circ_{denaturation}$ در محدوده دمایی 27°C تا 37°C برای DNA در بر همکنش با کمپلکس را تعیین کرد.

۴- نتیجه گیری

بر همکنش کمپلکس جدید پالادیوم با DNA مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد این کمپلکس می تواند DNA را در مقادیر کم غیر طبیعی کند با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ به احتمال قوی نوع بر همکنش کمپلکس DNA از نوع اینترکلیشن می‌باشد. با توجه به شکل ۴ با افزایش غلظت کمپلکس، انرژی آزاد گیبس کاهش می‌یابد. به این دلیل که با افزایش غلظت کمپلکس، تعداد بیشتری از جایگاه‌های پیوندی DNA توسط کمپلکس اشغال شده و موجب تغییر ساختار DNA و کاهش پایداری آن می‌شود. با تعیین معادله خط، عرض از مبدأ که همان $\Delta G^\circ_{(H_2O)}$ است و نشان دهنده پایداری DNA در عدم حضور کمپلکس می‌باشد، بدست آمده است که بزرگ بودن این پارامتر، نشان از پایداری بیشتر DNA می باشد[24]. با توجه به نزولی بودن نمودار تغییرات انتالپی (شکل ۵) می‌توان نتیجه گرفت که این برهمکنش گرمازا است و مقادیر مثبت آنتروپی (ΔS°) به طور معمول دلیل بر، برهمکنش هیدرو فوبی می‌باشد [25].

۵- مراجع

1. M. I-Moghaddam, M. Saidifar, F. Rostami-Charati, D. Ajloo, M. Ghadamgahi, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2014, 17, 781-789*
2. M. Saidifar, H. Mansouri-Torshizi, Y. Palizdar, M. I-Moghaddam, A. Divsalar, A.A.Saboury, *Acta Chim. Slov., 2014, 61, 126*
3. J.L. van der Veer, J. Reedjik, *Chem. Brit,. 1985, 20 , 775*
4. R.F. Ozds, R.C. Young, *Semin. Oncol,. 1985, 12, 21*
5. M. I-Moghaddam, M. Saidifar, A. Divsalar, H. Mansouri-Torshizi, A.A.Saboury, H. Farhangian, M. Ghadamgahi, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2016, 34, 206*
6. Szucova. L., Travnicek. Z., Zatloukal. M., Popa. I., *Bioorg. Med. Chem., 2006, 14, 479*
7. Natile, G., Coluccia, M., *Coord. Chem. Rev., 2001, 216, 383*

8. Gao, E., Wang, L., Zhu, M., Liu, L., Zhang, W., *Eur. J. Med. Chem., 2010,45, 311*
9. Erkkila, K.E., Odom, T.D., Barton, J.K., *Chem. Rev., 1999, 99, 2777*
10. Metcalfe, C., Thomas, J.A., Kinetically *Chem. Soc. Rev., 2003, 32, 215*
11. Tan, L.-F., Liu, X.-H., Chao, H., Ji, L.-N., *J. Inorg. Biochem., 2007, 101, 56*
12. Tusek-Bozic, L., Juribasic, M., Traldi, P., Scarcia, V., Furlani, A., *Polyhedron, 2008, 27, 1317*
13. Higgins III, J.D., Neely, L., Fricker, S., *J. Inorg. Biochem., 1993, 49, 156*
14. Kovala-Demertzi, D., Demertzis, M.A., Filiou, E., Pantazaki, A.A., Yadav, P.N., Miller, J.R., Zheng, Y., Kyriakidis, D.A., *Biometals,*, 2003, 16, 411
15. Zhuang, L., Wai, J.S., Embrey, M.W., Fisher, T.E., Egbertson, M.S., Payne, L.S., Guare Jr., J. P., Vacca, J.P., Hazuda, D.J., Felock, P.J., Wolfe, A.L., Stillmock, K.A., Witmer, M.V., Moyer, G., Schleif, W.A., Gabryelski, L.J., Leonard, Y.M., Lynch Jr., J.J., Michelson, S.R., Young, S.D., *J. Med. Chem., 2003, 46, 453*
16. Shaw, A.Y., Chang, Ch.-Y., Hsu, M.-Y., Lu. P.-J., Yang, Ch.-N., Chen, H.-L., Lo, Ch.-W., Shiau, Ch.-W., Chern, M.-K., *Europ. J. Med. Chem., 2010, 45, 2860*
17. Gershon, H., Parmegiani, R., *Appl. Microbiol., 1962, 10, 348*
18. Negm, N.A., Morsy, S.M.I., Said, M.M., *Bioorg.Med.Chem., 2005, 13, 5921*
19. Yamato, M., Hashigaki, K., Yasumoto, Y., Sakai, J., Tsukagoshi, S., Tashiro, T., Tsuruo, T., The synthesis and antitumor *Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 3496*
20. Moret, V., Laras, Y., Cresteil, T., Aubert, G., Ping, D.Q., Di, C., BarthélémyRequin, M., Béclin, C., Peyrot, V., Allegro, D., Rolland, A., De Angelis, F., Gatti, E., Pierre, P., Pasquini, L., Petrucci, E., Testa, U., Kraus, J.-L., *Eur. J. Med. Chem., 2009, 44, 558*
21. Jin, V.X., Ranford, J.D., *Inorg. Chim. Acta, 2000, 304, 38*
22. Grant, M.; Baron, R.; Macias, M.; Layne, M.; Perrella, M., *Biochem. J., 2009, 418, 103.*
23. Greene, R. F., & Pace, C. N. *Journal of Biological Chemistry, 1974, 249, 5388*
24. Cao, Y.; He, Xi-w., *Spectrochim. Acta. A*, 1998, 54, 883.
25. Divsalar A.; Saboury, A. A.; Mansoori-Torshizi; H.; Eslami, M. M.; Ahmad, F.; Hakimelahi, G. H., *J. Biomol. Struc., 2009, 26, 5, 587.*