اثرات سمیت سلولی کمپلکس‌های پالادیم دارای لیگاندهای اسکواریک و سولفوسوکسینیک اسید بر روی رده‌های سلولی سرطانی

هادی ادیبی[1]*؛ نرگس زندیه[2]؛ کامران منصوری[3]

چکیده

زمینه: مشتقات کمپلکس‌های فلزی می‌توانند نقش مؤثری در درمان سرطان‌ها داشته باشند. در این بین بیشترین ترکیبات مورد استفاده موجود در بازار مشتقات پلاتین است که از عوارض بالایی برخوردار است، در حالی که مشتقات پالادیم عوارض کم‌تری را از خود نشان داده و برروی بسیاری از سرطان‌ها به‌طور مؤثرتری عمل می‌کند.

روش‌ها: تعدادی از کمپلکس‌های فلزی پالادیم برپایه لیگاندهای اسکواریک اسید و سولفوسوکسینیک اسید طراحی و برای ارزیابی بیولوژیکی سنتز شدند.

یافته‌ها: اثرات سمیت سلولی کمپلکس‌های سنتزشده شامل دی‌یدو اسکواراتو پالادیم (II)، دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) و دی‌آمینو اسکواراتو پالادیم (II)، بر روی رده‌های سلولی Hela، MCF-7، K562، PC3 و HUVEC مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اثر سمیت سلولی از روش‌های اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز (LDH) و رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر روی رده‌های مختلف سلولی استفاده شد و نتایج با سیس پلاتین مقایسه شد.

نتیجه‌گیری: بررسی اتصال گروه‌های جدید به فلز پالادیم نشان داد ترکیب دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم سمیت بیشتری نسبت به ترکیب شاهد بر سلول‌های نرمال دارد. در مقایسه ترکیبات به این نتیجه رسیدیم که حضور گروه آمین سبب افزایش اثربخشی شده است. جابه‌جایی اتم‌های ید با گروه آمین در ترکیب دی‌آمین اسکواراتو پالادیم سبب افزایش اثربخشی ترکیب بر رده‌های سلولی سرطانی شده است. ترکیب دی‌آمین اسکواراتو پالادیم بیشترین اثر را روی رده PC_3 و کم‌ترین اثر را بر روی Hela به‌ترتیب با IC_{50}های 4/33 و 18/88 میکرومولار نشان داد. این ترکیب همچنین سمیت سلولی کم‌تری بر روی HUVEC نسبت به سیس پلاتین از خود نشان داد.

کلیدواژه‌ها: سنتز، کمپلکس‌های پالادیم، سمیت سلولی، لیگاندهای اسکواریک و سولفوسوکسینیک اسید

«دریافت: 1393/6/8 پذیرش: 1393/11/7»

1. مرکز تحقیقات دارورسانی نوین، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

***عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات دارورسانی نوین. تلفن: 083-34276480، فاکس: 083-34276493، Email: hadibi@kums.ac.ir

مقدمه

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن به‌طور غیرعادی تقسیم می‌شوند و بافت‌های سالم اطراف را نابود می‌کنند. تاکنون علت دقیق سرطان نامشخص است ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا عوامل بیرونی هم‌چون ویروس و مواد سرطان‌زا مؤثر باشد. عوامل ژنتیکی از علل اصلی ایجاد سرطان به‌حساب می‌آیند. اغلب رخدادهایی که منجر به بروز فنوتیپ‌های سرطانی می‌شوند، تحت کنترل ژنتیک قرار دارند (1 و 2). جهش‌های خاص یا حذف‌های ژنی عمده منجر به تکثیر سلولی کنترل‌نشده می‌گردند. پروتوانکوژن‌ها (Proto-oncogenes) ژن‌هایی هستند که طی روند تکامل باقی

مانده‌اند و نقش مهمی در تکثیر سلولی طبیعی دارند. هنگامی که پروتوانکوژن‌ها دچار جهش می‌شوند، ممکن است به انکوژن‌هایی تبدیل شوند که با تولید فرآورده‌های پروتئینی یا فعال کردن ژن‌های مجاور سبب ایجاد تغییرات شدید در رشد سلولی گردند (**3** و **4**). عوامل بیرونی چون الکل، دود سیگار، بیماری‌های ویروسی، آفلاتوکسین‌ها و مواد رادیواکتیویته می‌توانند نقش مهمی در ایجاد سرطان داشته باشند. اغلب سرطان‌ها به چهار دسته عمده تقسیم می‌شوند که شامل: کارسینوم، سارکوم، لوسمی و لنفوم‌ها هستند (**2** و **3**). روش‌های اصلی درمان سرطان عبارت‌اند از: شیمی درمانی، پرتو درمانی، جراحی و آنتی آنژیوژنز که در بین آن‌ها شیمی‌درمانی یک شیوه رایج در معالجه بیماری‌هاست که سلول‌های سرطانی را با استفاده از داروها و مواد شیمیایی از بین می‌برند. عمده داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی می‌توانند در دسته‌های عوامل آلکیله‌کننده، آنتی‌متابولیت‌ها، آنتراسیکلین‌ها، ممانعت‌کننده‌های توپوایزومرازها و عوامل ضدتومور قرار گیرند. تمام این داروها بر روی تقسیم سلولی اثر می‌گذارند و یا مانع سنتز شدن DNA می‌گردند. دو گروه از داروهای مهم شیمی‌درمانی شامل عامل‌های آلکالوئید و آنتی‌متابولیت‌ها می‌باشند. عوامل آلکیله‌کننده (LO**1**A) یا عوامل آلکالوئید (شبه قلیایی) توانایی این را دارند که گروه قلیایی این داروها با تعداد زیادی از گروه‌های الکترونگاتیو در محیط سلول جفت شده و پیوند دهند. سیس پلاتین، کربوپلاتین واکسالی پلاتین همه از این نوعند که به‌وسیله تغییر شیمیایی در DNA سلول عمل می‌کنند. دسته آنتی‌متابولیت‌ها (LO**1**B) از تقسیم سلول با مهار ساخت DNA جلوگیری می‌کنند (**4** و **5**). مشتقات کمپلکس‌های فلزی می‌توانند نقش مؤثری در درمان سرطان‌ها داشته باشند. تحقیقات بسیاری بر روی کمپلکس‌های فلزی صورت گرفته است و مشخص شده که فلزاتی مثل پالادیم، پلاتین و کبالت اثرات سایتوتوکسیسیتی قوی دارند. مشتقاتی که از پالادیم ساخته شده همه در فاز اول و دوم پاراکلینیکی هستند و هنوز تحقیقات بر روی آن‌ها کامل نشده و جزء داروهای جدید برای مهار سرطان محسوب می‌شوند. از این ترکیبات به‌عنوان مثال می‌توان به پالادیم ترپی پروفلاوین اشاره کرد که بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی آن بر روی سرطان‌های سینه و رحم اثرات قوی‌تری را نسبت به داروهای موجود در بازار از خود نشان داده است (**6-10**). هدف از پژوهش حاضر ساخت مشتقات جدیدی از کمپلکس‌های فلزی پالادیم دارای لیگاندهای اسکواریک وسولفوسوکسینیک اسید با اثرات سمیت سلولی می‌باشد که بتواند تقسیم سلولی را مهار کند.

مواد و روش‌ها

مواد: کلیه ترکیب‌های شیمیایی مورد استفاده در این مقاله از کارخانه مرک آلمان خریداری شد.

دستگاه‌ها: طیف‌نگار مادون قرمز ساخت کارخانه Shimadzu ژاپن، دستگاه اندازه‌گیری نقطه ذوب مدل Electrothermal ساخت انگلستان، دستگاه آنالیز عنصری مدل ترموفیشر ساخت آمریکا و دستگاه طیف‌سنج جرمی مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (**1**): یک میلی‌مول پتاسیم تتراکلروپالادات (II) (K_2PdCl_4، **0/326** گرم) در آب حل شد و داخل بالن ریخته شد و با **5** میلی‌مول پتاسیم یداید (**0/830** گرم) (نسبت استوکیومتری **1** به **5**) واکنش داده شد و اجازه داده شد در دمای اتاق به‌هم زده شود. سپس یک میلی‌مول اسکواریک اسید (**0/114** گرم) در آب داغ **80** درجه سانتی‌گراد حل شد، اسکواریک اسید حل‌شده در آب به ارلن در حال چرخش حاوی پتاسیم یداید و پتاسیم تتراکلروپالادات (II) اضافه شد و اجازه داده شد واکنش به‌مدت **24** ساعت در دمای اتاق به هم زده شود. پس از **48** ساعت رسوب دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (**1**) حاصل شد. رنگ ترکیب پتاسیم تتراکلروپالادات (II) قهوه‌ای روشن است. با اضافه شدن پتاسیم یداید، ترکیب به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید. رنگ محیط در حضور اسکواریک اسید هم

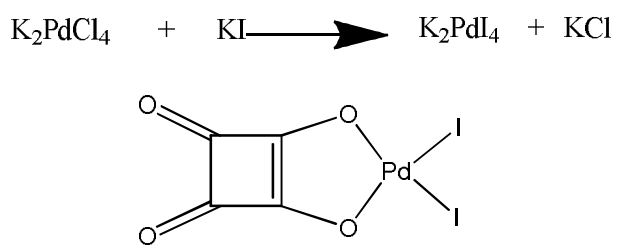
تیره‌رنگ است. پس از انجام واکنش رسوب به‌وسیله سانتریفیوژ از محیط مایی جدا و در آون خشک شد. پس از خشک کردن، با استفاده از فنون طیف‌سنجی (IR، طیف جرمی و آنالیز عنصری) ساختار ترکیب شناسایی شد (شکل **1**).

سنتز دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) **(2)**: یک میلی‌مول از پتاسیم تتراکلروپالادات (II) (K_2PdCl_4، **0/326** گرم) با یک میلی‌مول سولفوسوکسینیک اسید **(0/216** گرم) در حضور **5** میلی‌مول پتاسیم یداید **(0/830** گرم) (نسبت استوکیومتری **1** به **5**) واکنش داده شد و به مدت **24** ساعت در دمای اتاق به‌هم زده شد.

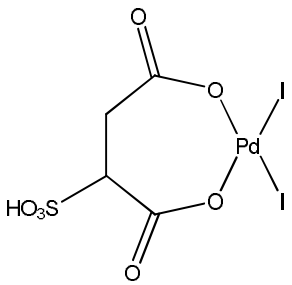
پس از این مدت کمپلکس از رنگ مشکی به قهوه‌ای تغییر رنگ داد. کمپلکس حاصله سانتریفیوژ و سپس خشک شد. برای شناسایی ترکیب موردنظر از تکنیک‌های طیف‌سنجی استفاده گردید (شکل **2**).

سنتز دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II) **(3)**: یک میلی‌مول از پتاسیم تتراکلروپالادات (II) (K_2PdCl_4، **0/326** گرم) با یک میلی‌مول اسکواریک اسید (**0/114** گرم) در حضور **5** میلی‌مول پتاسیم یداید (**0/830** گرم) (نسبت استوکیومتری **1** به **5**) واکنش داده شد و اجازه داده شد به مدت **48** ساعت در دمای اتاق به‌هم زده شود. پس از **24** ساعت دی یدواسکواراتو پالادیم (II) **(1)** حاصل شد. در ادامه سنتز به هر یک میلی‌مول از دی یدواسکواراتو پالادیم (II) **(1)**، دو میلی‌مول نیترات نقره (با نسبت استوکیومتری دو به یک) در شرایط تاریکی اضافه گردید و به مدت **36** ساعت به‌هم زده شد. پس از اتمام **36** ساعت رنگ محیط حاوی کمپلکس اسکواراتو پالادیم (II) نیترات به‌صورت خاکستری روشن درآمد (شکل **3**).

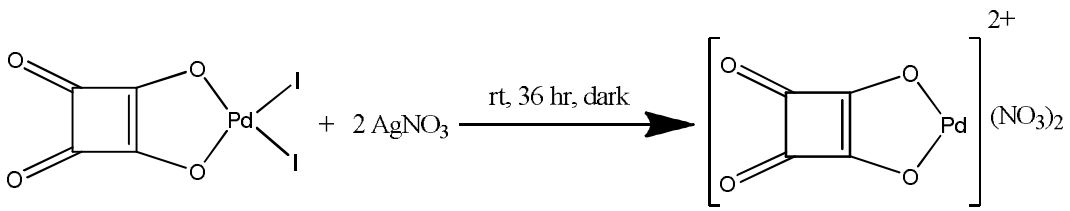
پس از این مرحله چون نیترات جای ید را در کمپلکس اشغال کرده بود کمپلکس به‌صورت محلول در می‌آمد. به‌همین علت ابتدا محیط مائی را از رسوب جدا کردیم و سپس به محلول مرحله قبل که در حال چرخش بود آمونیاک به‌صورت قطره قطره اضافه شد و به مدت **72** ساعت به‌هم زده شد. آمونیاک با کمپلکس محلول در آب واکنش داده گروه آمین جایگزین گروه نیترات شده و به‌صورت رسوب دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II) **(3)** ته‌نشین شد. رسوب به‌وسیله سانترفیوژ از محیط مائی جدا و سپس در آون خشک شد. برای شناسایی ترکیب مورد نظر از تکنیک‌های طیف‌سنجی استفاده شد (شکل **4**).



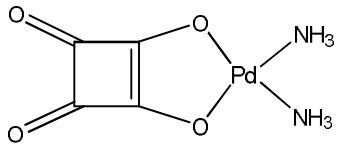
شکل 1 - سنتز دی یدواسکواراتو پالادیم (II) **(1)**



شکل 2 - سنتز دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) **(2)**



شکل 3 - سنتز اسکواراتو پالادیم (II) نیترات



شکل 4 - سنتز دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II) **(3)**

روش بررسی آزمون لاکتات دهیدروژناز (LDH): در این آزمایش سلول‌ها پس از کشت در میکروپلیت‌های موردنظر پس از رشد و تکثیر مناسب، با ماده مورد آزمایش با غلظت‌های **2**، **4**، **8**، **16**، **32**، **64** و **128** میکرومولار اثر داده شد و پس از **48-24** ساعت کیت LDH روی سلول‌ها اعمال گردیده و سپس جذب نمونه‌ها در **500-490** نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

روش بررسی آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو: در این آزمون چند قطره از محیط سلولی هر چاهک با حجم برابری از رنگ محلول در آب نظیر تریپان بلو **0/4** درصد مخلوط شد. همان‌طور که اشاره شد، رنگ زمانی قابل مشاهده است که به درون سلول‌هایی با غشاء آسیب دیده انتشار یابد. محلول حاصله روی لام نئوبار ریخته شده و تعداد کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ‌شده با تریپان بلو شمارش گردید. با شمارش کل سلول‌ها، سلول‌های رنگ‌گرفته (آسیب دیده) و سلول‌های رنگ‌نگرفته (سالم) می‌توان درصد بقاء و مرگ سلول‌ها را تعیین کرد که معمولاً از فرمول درصد بقاء سلول‌ها استفاده می‌شود.

100×(تعداد کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های رنگ نگرفته) = درصد بقاء

100×(تعداد کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های رنگ گرفته) = درصد مرگ

بررسی اثرات سمیت سلولی: در این بررسی از رده‌های سلولی سرطان رحم (Hela) و سینه (MCF_7) و سرطان خون رده میلوییدی (K_{562}) و PC_3 برای بررسی اثرات سمیت سلولی کمپلکس‌های مورد نظر استفاده شد. همچنین از یک رده سلول نرمال از بند ناف انسان (HUVEC) استفاده شد. ابتدا از پودرهای آماده دارویی استوک تهیه شد. بدین‌طریق که **3** میلی‌گرم از مواد توزین‌شده در **100** میکرولیتر DMSO حل شده و با **900** میکرولیتر محیط کشت رقیق شد که در نهایت استوک ما با غلظت **3** میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. در مرحله بعد زیر هود، از استوک مواد با رقیق‌سازی توسط محیط کشت، غلظت‌های **2**، **4**، **8**، **16**، **32**، **64** و **128** میکرومولار تهیه گردید. کلیه مراحل کشت سلول تحت شرایط استریل و زیر هود لامینار مخصوص کشت سلول انجام شد. لازم به ذکر می‌باشد که جهت استریل کردن محیط، همه‌روزه قبل از شروع به کار در آزمایشگاه لامپ UV اتاق کشت سلول به‌مدت **20** دقیقه روشن می‌گردید و سپس کار آغاز می‌شد. در تمامی مراحل از دستکش لاتکس استفاده می‌شد و تمام سطوح توسط اتانول **70** درجه ضدعفونی می‌گردید.

یافته‌ها

در این تحقیق پس از مرحله سنتز سه ترکیب موردنظر با راندمان‌های مورد نظر به‌دست آمد (جدول **1**). مواد به‌دست آمده در آب نامحلول هستند. به دلیل پودری بودن مواد، موفق به گرفتن کریستال از آن‌ها نشدیم. در ذیل اطلاعات مربوط به ترکیب‌های نهایی به‌تفکیک آمده است:

بررسی طیف دی یدواسکواراتو پالادیم (II) **(1)**

Chemical Formula: $C_4I_2O_4Pd$
Molecular Weight: 472.27
m.p. = 166-169 ^oC (decomposition)
Elemental Analysis (Calculated): C, 10.17; O, 13.55.
Elemental Analysis (Found): C, 10.22; O, 13.63.
IR (KBr, cm^{-1}): υ 1700 (C = O)

در طیف مادون قرمز این ترکیب یک نوار ضعیف مربوط به گروه کربونیل در محدوده cm^{-1} **1650** دیده می‌شود. در طیف جرمی این ترکیب قطعه **456**=m\z مربوط به شکسته شدن یکی از پیوندهای کربن-اکسیژن و جدا شدن اکسیژن است. **346**=m\z نیز جدا شدن یک اتم ید را نشان می‌دهد. **472**=m\z مربوط به وزن مولکولی خود ماده است. داده‌های آنالیز عنصری نیز ساختار

کمپلکس تشکیل شده را تأیید می‌کند.

MS: m\z: 472 (M^+), 456 (M-16), 424 (M-48), 419 (M-53), 304 (M-168), 346 (M-126).

بررسی طیف دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (2)

Chemical Formula: $C_3H_2I_2O_7PdS$
Molecular Weight: 556.36
m. p. = 195-199 °C (decomposition)
Elemental Analysis (Calculated): C, 8.46; H, 0.72; O, 20.13; S, 5.76
Elemental Analysis (Found): C, 8.55; H, 0.79; S, 5.85; O, 20.34
IR (KBr, cm^{-1}): υ 1310(S=C), 1600(C=O)

در طیف مادون قرمز این ترکیب یک نوار در ناحیه **1310**cm^{-1} دیده می‌شود که مربوط به گروه سولفونیل است. همچنین یک نوار در ناحیه **1600**cm^{-1} دیده می‌شود که مربوط به گروه کربونیل است.

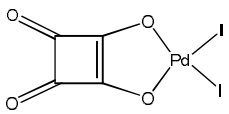
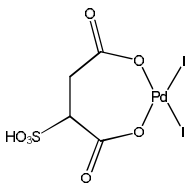
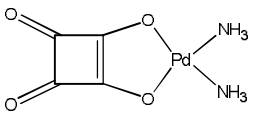
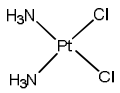
MS: m\z: 556 (M^+), 523 (M-33), 475 (M-81), 447 (M-109), 439 (M-117), 419 (M-137).

در طیف جرمی مربوط به این ترکیب، فراوان‌ترین قطعه تشکیل‌شده در محفظه یونیزاسیون، مربوط به m/z=**439** می‌باشد. قطعه تشکیل‌شده در m/z=**447** مربوط به جدا شدن قطعه SO_3H و C=O است. m/z=475 مربوط به جدا شدن گروه SO_3H است. m/z=556 مربوط به وزن مولکولی ماده است. داده‌های آنالیز عنصری با ساختار ترکیب مطابقت می‌کند.

بررسی طیف دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II) (3)

Chemical Formula: $C_4H_6N_2O_4Pd$
Molecular Weight: 252.52
m. p. = 181-185 °C (decomposition)
Elemental Analysis (Calculated): C, 19.03; H, 2.39; N, 11.09; O, 25.34.
Elemental Analysis (Found): C, 19.44; H, 2.45; N, 11.20; O, 25.44
IR (KBr, cm^{-1}): υ 1600 (C=O), 3200 (NH_2)

جدول 1- بررسی اثر ضدسرطانی ترکیبات سنتز شده بر روی رده‌های مورد مطالعه با استفاده از روش LDH (IC_{50} برحسب میکرومولار)

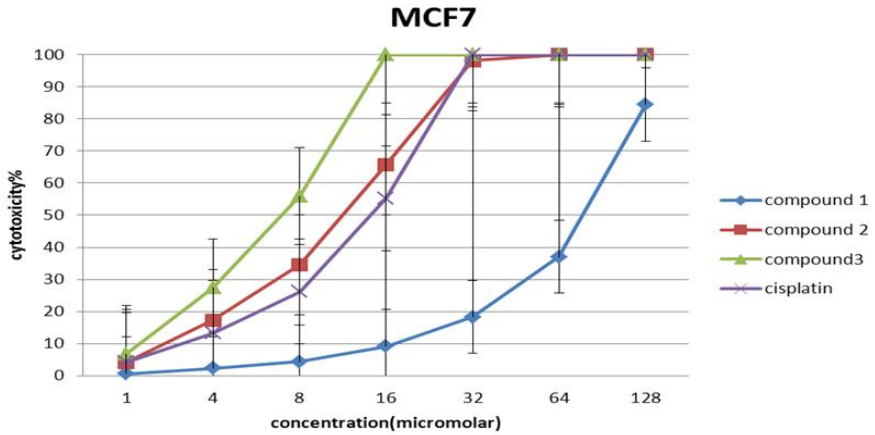
Compound	Yield (%)	MCF7	PC3	Hela	K562	HUVEC
 دی یدواسکواراتو پالادیم (II) **(1)**	**50**	**96/20**	**60/96**	**58/28**	**51/50**	**77/66**
 دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) **(2)**	**95**	**13/44**	**56/2**	**37/60**	**34/62**	**58/33**
 دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II) **(3)**	**33**	**7/90**	**4/33**	**18/88**	**11/28**	**40/116**
 سیس پلاتین		**14/91**	**4/56**	**16/5**	**13/38**	**96/01**

در طیف مادون قرمز نوار ناحیه $1600cm^{-1}$ مربوط به گروه کربونیل است. همچنین در ناحیه $3200-3300cm^{-1}$ نواری دیده می‌شود که مربوط به گروه آمین است.

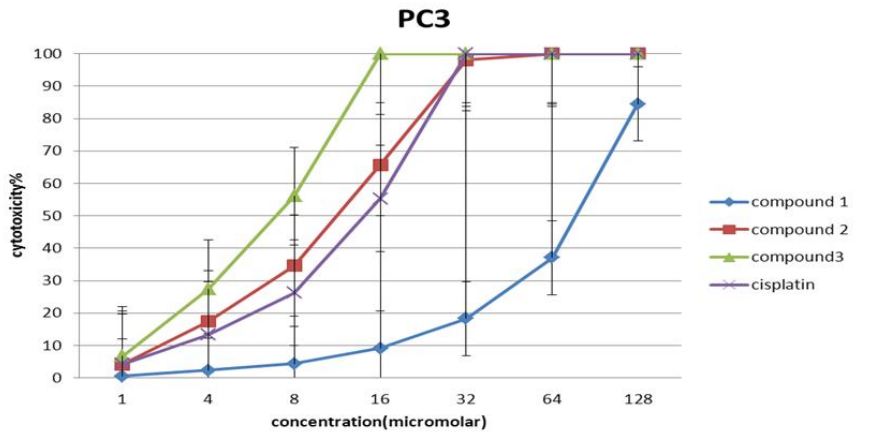
MS: m\z: 252 (M^+), 236 (M-16), 202 (M-50), 181 (M-71), 165 (M-87).

قطعه تشکیل‌شده در m/z=236 مربوط به جدا شدن اکسیژن و شکستن پیوند C=O است. **252** =m/z مربوط به وزن مولکولی ماده است.

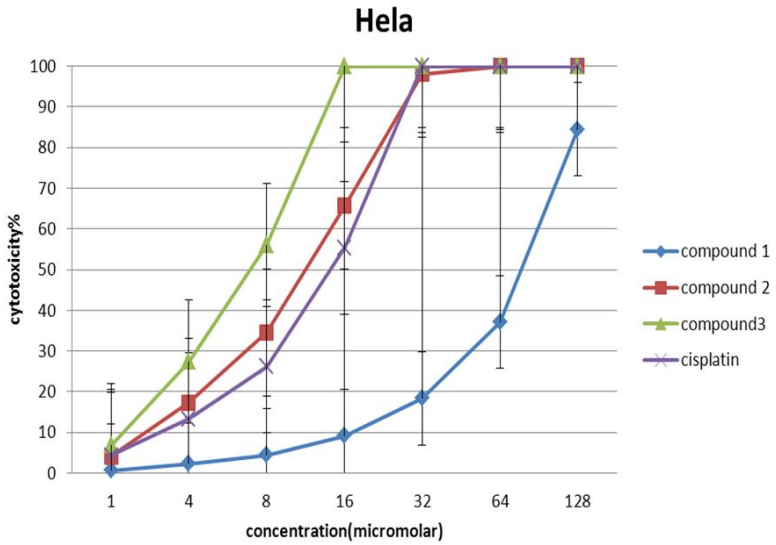
بررسی نتایج بیولوژیک: اثر سمیت سلولی کمپلکس‌های سنتزشده بر روی **4** رده سلول سرطانی (MCF7، Hela، **K562**، PC**3**) و یک رده سلول طبیعی (HUVEC) با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و اندازه‌گیری میزان لاکتات دهیدروژناز آزاد شده مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده از ترکیبات سنتزشده به‌ترتیب برابر با نتایج بررسی سمیت سلولی با استفاده از LDH (جدول **1**) و نتایج بررسی آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو به‌دست آمد (نمودارهای **5-1**).



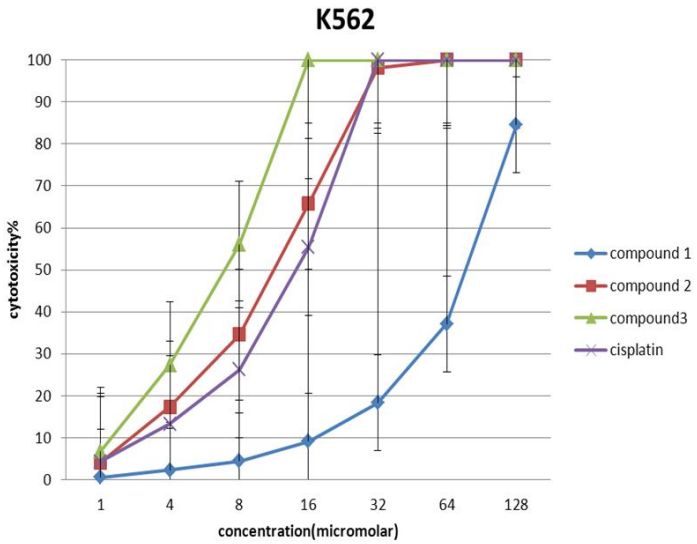
نمودار 1- نتایج بررسی اثر سمیت سلولی دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (ترکیب **1**)، دی‌یدوسولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (ترکیب **2**)، دی‌آمین اسکواراتوپالادیم (II) (ترکیب **3**)، و سیس پلاتین (ترکیب **4**) با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر روی رده‌ی سلولی MCF7. غلظت‌های به‌دست آمده بر حسب میکرومولار نمایشگر میانگین حاصل از سه تکرار مستقل است.



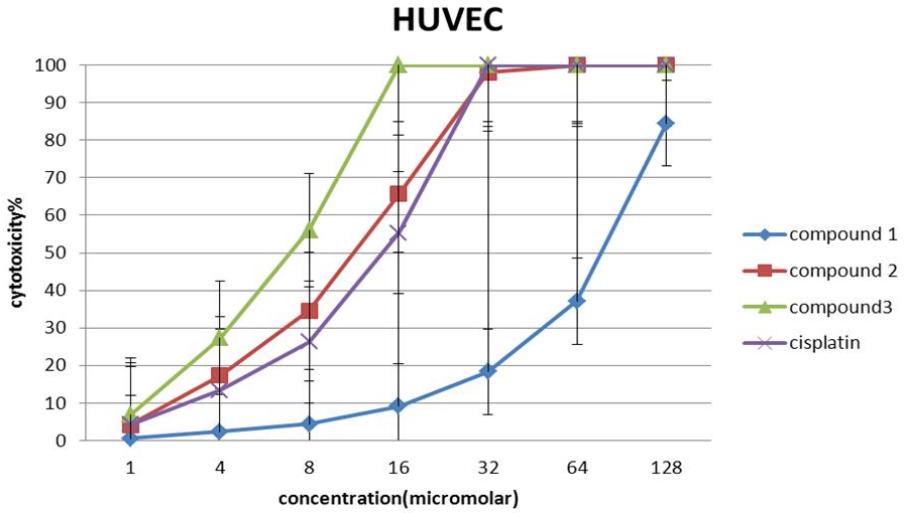
نمودار 2- نتایج بررسی اثر سمیت سلولی دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (ترکیب **1**)، دی‌یدوسولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (ترکیب **2**)، دی‌آمین اسکواراتوپالادیم (II) (ترکیب **3**)، و سیس پلاتین (ترکیب **4**) با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر روی رده‌ی سلولی PC_3. غلظت‌های به‌دست آمده بر حسب میکرومولار نمایشگر میانگین حاصل از سه تکرار مستقل است.



نمودار 3 - نتایج بررسی اثر سمیت سلولی دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (ترکیب **1**)، دی‌یدوسولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (ترکیب **2**)، دی‌آمین اسکواراتوپالادیم (II) (ترکیب **3**)، و سیس پلاتین (ترکیب **4**) با استفاده از رنگ‌آمیزی ترپیان بلو بر روی رده‌ی سلولی Hela. غلظت‌های به‌دست آمده بر حسب میکرومولار نمایشگر میانگین حاصل از سه تکرار مستقل است.



نمودار 4 - نتایج بررسی اثر سمیت سلولی دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (ترکیب **1**)، دی‌یدوسولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (ترکیب **2**)، دی‌آمین اسکواراتوپالادیم (II) (ترکیب **3**)، و سیس پلاتین (ترکیب **4**) با استفاده از رنگ‌آمیزی ترپیان بلو بر روی رده‌ی سلولی K_{562}. غلظت‌های به‌دست آمده بر حسب میکرومولار نمایشگر میانگین حاصل از سه تکرار مستقل است.



نمودار 5 - نتایج بررسی اثر سمیت سلولی دی‌یدواسکواراتو پالادیم (II) (ترکیب **1**)، دی‌یدوسولفوسوکسیناتو پالادیم (II) (ترکیب **2**)، دی‌آمین اسکواراتوپالادیم (II) (ترکیب **3**)، و سیس پلاتین (ترکیب **4**) با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر روی رده‌ی سلولی HUVEC. غلظت‌های به‌دست آمده بر حسب میکرومولار نمایشگر میانگین حاصل از سه تکرار مستقل است.

بحث

بررسی اثرات ترکیبات سنتزشده بر روی رده سلولی طبیعی (HUVEC) با استفاده از اندازه‌گیری میزان لاکتات دهیدروژناز: لازم به ذکر است که هرچه سمیت یک ترکیب ضدسرطانی بر روی سلول‌های نرمال بدن کم‌تر باشد ترکیب دارای عوارض جانبی کم‌تر خواهد بود. همان‌طور که اشاره کردیم از مشکلات عمده ترکیبات ضدسرطان غیرانتخابی بودن آن‌هاست. این ترکیبات به‌دلیل اثر بر سلول‌های طبیعی بدن سبب ایجاد عوارض نامطلوب می‌شوند. مقایسه اثرات ترکیبات سنتزشده بر روی رده سلولی طبیعی (HUVEC) نشان می‌دهد که ترکیبات **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) و **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) سمیت بیشتری نسبت به سیس پلاتین دارند. در این بین ترکیب شماره **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) که دارای استخلاف آمین و اسکواریک اسید است، از سمیت کم‌تری نسبت به سیس پلاتین برخوردار است. ترکیب دارای IC_{50} برابر با **116/40** میکرومولار است، در مقایسه با **96/01** میکرومولار سیس پلاتین دارو از سمیت کم‌تری برخوردار است. ترکیب شماره **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) از سمیت بیشتری نسبت به بقیه برخوردار است (جدول **1**).

بررسی اثر ترکیبات بر رده‌ی سلولیMCF7: در این رده قدرت اثر ترکیبات **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) و **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) از ترکیب شاهد (سیس پلاتین) بیشتر است. در بین ترکیبات سنتزشده قوی‌ترین ماده ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) با IC_{50} **7/90** میکرومولار است. کم‌ترین قدرت اثر متعلق به ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) است. در مقایسه ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) با دو ترکیب سنتزشده دیگر متوجه می‌شویم که ظاهراً حضور گروه NH_3 در ترکیب سبب افزایش اثربخشی بر رده MCF7 شده است. از طرفی وجود گروه اسکواریک اسید موجب مسطح شدن کمپلکس و افزایش اثر می‌شود. در ترکیب شماره **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) که اتم‌های ید اتصال یافته است کم‌ترین اثر را شاهد هستیم. IC_{50} این ترکیب **96/20** میکرومولار است. IC_{50} ترکیب شماره **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو

پالادیم (II))، **13/44** میکرومولار است. IC_{50} سیس پلاتین **14/91** میکرومولاراست که در مقایسه با ترکیب **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) و **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) از اثر کم‌تری برخوردار است (جدول **1**).

بررسی اثر ترکیبات بر دو رده‌ی سلولی K562 و PC3: در دو رده سلولی K562 و PC_3 ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) با IC_{50}های **11/28** و **4/33** میکرومولار بیشترین اثر را داشته است. در این دو رده از لحاظ اثربخشی ماده **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) و **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) در رده اول و دوم قرار دارد و ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) اثری بهتر از سیس‌پلاتین نشان می‌دهد. کم‌ترین اثربخشی در بین ترکیبات سنتزشده به‌ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) تعلق دارد.

بررسی اثر ترکیبات بر رده سلولی Hela: کم‌ترین اثربخشی ترکیبات سنتزشده بر روی رده سلولی Hela بوده که هر سه اثری کم‌تر از سیس‌پلاتین را دارند. در بین ترکیبات سنتزی ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) با IC_{50} **18/88** میکرومولار بهترین اثر را داشته که نسبت به سیس‌پلاتین با IC_{50} **16/5** میکرومولار ترکیب ضعیف‌تری است.

مقایسه اثر بخشی تک تک ترکیبات

ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)): ترکیب **1** در همه رده‌های سلولی اثربخشی کم‌تری نسبت به سیس پلاتین داشته است ولی این ترکیب در رده HUVEC سمیت بیشتری نسبت به سیس‌پلاتین نشان داده است. بیشترین اثر این ترکیب در رده سلولی K_{562} و کم‌ترین اثر آن در رده سلولی MCF_7 با IC_{50}های **51/50** و **96/20** میکرومولار است.

ترکیب **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)): ترکیب **2** بیشترین اثر را بر روی رده MCF_7 نشان می‌دهد که اثربخشی آن از سیس‌پلاتین بیشتر است. کم‌ترین اثر ترکیب شماره **2** بر روی رده PC_3 با IC_{50} **56/2** میکرومولار می‌باشد. این ماده در رده HUVEC سمیت بیشتری را نسبت به دو ترکیب دیگر و سیس پلاتین از خود نشان داده است.

ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)): ترکیب شماره **3** که بیشترین اثر را نسبت به همه ترکیبات و سیس‌پلاتین بر روی همه رده‌ها به جز Hela از خود نشان داده، بیشترین اثر را روی رده PC_3 و کم‌ترین اثر را بر روی Hela به‌ترتیب با IC_{50}های **4/33** و **18/88** میکرومولار داشته است.

مقایسه داروها از لحاظ دوز مؤثر و دوز توکسیک: هر سه ترکیب با غلظت‌هایی کم‌تر از غلظت توکسیک بر همه رده‌های سلولی مؤثر است (IC_{50} همه رده‌های سلولی کم‌تر از IC_{50} رده سلولی HUVEC است به‌جز ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) بر رده سلولی MCF7).

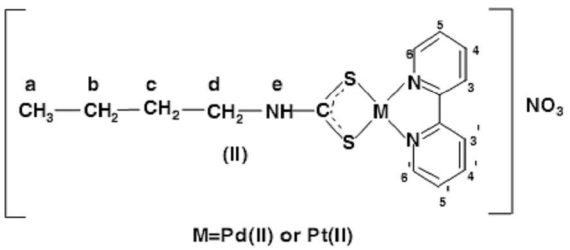
بررسی اثرات ترکیب‌های سنتزشده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو **0/4%**: نتایج به‌دست‌آمده از روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو نتایج حاصل از روش اندازه‌گیری LDH را تأیید می‌کند، سمیت ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) و **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) بر رده HUVEC بیشتر از ترکیب شاهد است. در این بین ترکیب **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) از سمیت بالاتری برخوردار است و ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) سمیت کم‌تری نسبت به سیس‌پلاتین بر روی رده HUVEC دارد. ترکیبات **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) و **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) مؤثرترین ترکیبات در رده سلولی MCF_7 هستند که خوشبختانه دوز درمانی این ترکیبات کم‌تر از دوز توکسیک آن‌ها در این رده سلولی است (نمودار **1**). جابه‌جایی اتم‌های ید با گروه آمین در ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) سبب افزایش اثربخشی ترکیب بر رده‌های سلولی سرطانی شده است. نمودارهای **3-1** نشان می‌دهد اثربخشی ترکیب سوم بر روی رده‌های

سلولی K_{562}، MCF_7 و PC_3 بهتر از سیس‌پلاتین می‌باشد و بر روی رده سلولی Hella (نمودار**3-3**) اثری مشابه سیس‌پلاتین دارد. نمودار مربوط به آزمون تریپان بلو و محاسبات آن توسط برنامه آماری SPSS انجام گرفت.

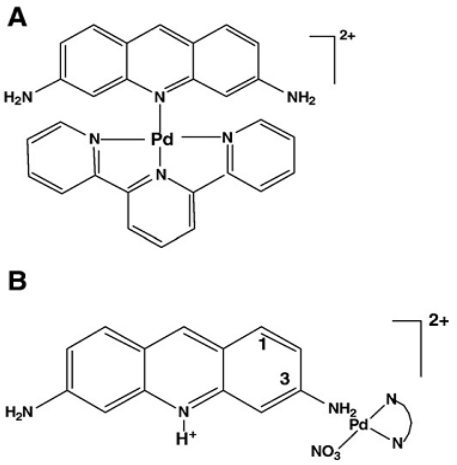
نگاهی به اثرات ترکیبات سنتز شده در مقالات:

- در سال **2008** منصوری و همکاران اثرات سایتوتوکسیسیتی و اتصال DNA مشتقات بای پیریدین پالادیم (شکل **5**) را بررسی کردند. این بررسی نشان داد که مشتقات پالادیم باعث شکست DNA به دوقسمت نامساوی می‌شود. در این بررسی غلظت‌های مختلف پالادیم برروی رده‌ی سلولی K_{562} اثر داده و معلوم شد IC_{50} این ترکیبات **14/5-18** میکرومول می‌باشد که در مقایسه با ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) سنتزی ما اثر کم‌تری را از خود نشان داده است (**11**). ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) با IC_{50} **11/28** اثربخشی بهتری را نسبت به ترکیبات سنتزی در این مقاله داشته است.

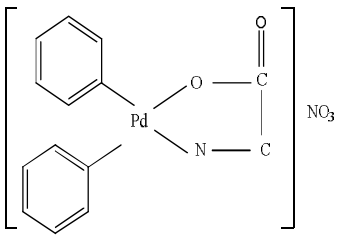
در سال **2010** در مقاله‌ای توسط ایرنه کژدان به بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی پالادیم پروفلاوین (شکل **6**) پرداختند، این کمپلکس‌ها برروی سرطان سینه و رحم مقاوم به سیس‌پلاتین آزمایش شدند و نتایج بسیارخوبی نسبت به سیس پلاتین از خود نشان دادند (**12**). بررسی اثرات این ترکیبات بر روی رده سلولی MCF_7 نسبت به ترکیبات سنتزی ما با IC_{50} بین **2-7** میکرومولار اثرات بسیار بهتری را نشان می‌دهد که باعث برتری این ترکیبات نسبت به سیس‌پلاتین نیز شده است.



شکل 5 - کمپلکس‌های پلاتین و پالادیم با بای پیریدین



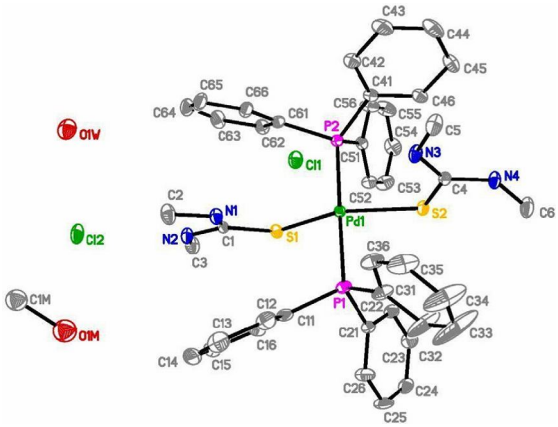
شکل 6 - کمپلکس‌های پالادیم و پروفلاوین



شکل 7 - کمپلکس‌های پالادیم و بتالاکتوگلوبین

- یوسفی و همکارانش به بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین پالادیم (شکل **7**) پرداختند (**13**). این بررسی روی رده سلولی K562 لکوسیت انجام پذیرفت و CC_{50} آن **20** میکرومولار بود که ترکیب **3** (دی‌آمین اسکواراتو پالادیم (II)) ما اثربخشی بهتری را از خود نشان داده‌اند.

- در سال **2008** توسط مایکل بولت و شفق نادم کمپلکس‌های تیامیدی و تری‌فنیل فسفین پالادیم دارای خاصیت آنتی‌باکتریال و سایتوتوکسیک سنتز و مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ترکیپ سنتز دارای خاصیت آنتی‌باکتریال مؤثر بوده و بر روی رده سلولی PC_3 اثرات مشابه دوکسو روبین داشت (**14**). اثربخشی ترکیب **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) سنتزی ما بر روی رده PC_3 با CC_{50} **3/93** میکرومولار در مقایسه با نتایج گزارش شده اثر بهتری را نشان می‌دهد. همچنین اثر ترکیبات **1** (دی یدواسکواراتو پالادیم (II)) و **2** (دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II)) نیز با این ترکیبات قابل مقایسه است (شکل **8**).



شکل 8 - کمپلکس‌های پالادیم و تری فنیل فسفین

در سال **1388** ادیبی و همکاران طی مطالعه‌ای به بررسی کمپلکس پلاتین با لیگاند اسکواریک اسید پرداختند (**15**). طی این مطالعه بررسی سمیت سلولی بر روی **4** رده سلول سرطانی (MCF$_7$، Hela، PC$_3$ و SK- N-MC) و یک رده سلول طبیعی (HUVEC) با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و اندازه‌گیری میزان لاکتات دهیدروژناز آزادشده انجام شد. نتایج حاصل در مقایسه با کمپلکس‌های سنتزی ما نشان می‌دهد که با تغییر فلز پلاتین به پالادیم، میزان سمیت سلولی بر روی رده انسانی کم‌تر شده و ترکیب سمیت کم‌تری را بر روی بافت‌های انسانی از خود نشان می‌دهد (**16**).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه هدف بر این بود تا با اتصال دادن گروه‌های جدید به فلز پالادیم میزان اثربخشی ترکیبات جدید بررسی و گزارش شود. ترکیب دی‌یدو سولفوسوکسیناتو پالادیم (II) سمیت بیشتری را نسبت به ترکیب شاهد بر سلول‌های نرمال دارند. در مقایسه خود ترکیبات این نتیجه حاصل شد که حضور گروه آمین سبب افزایش اثربخشی ترکیبات شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌خاطر حمایت‌های مالی طرح، کمال تشکر را دارند. همچنین این طرح به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه نرگس زندیه جهت دریافت درجه دکترای حرفه‌ای داروسازی در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد.

References

1. Skeel RT. Handbook of cancer chemotherapy. 6st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2003;53-7.
2. Divsalar A, Saboury A, Yousefi R, Moosavi-Movahedi A, Mansoori-Torshizi H. Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium (II) complexes: Lactoglobulin and K562 as the targets. Int J Biol Macromol. 2007;40(4):381-6.
3. Tatyana V, Irene K, Motley M, Walmsley J. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of palladium(II)–proflavine complexes. J Inorg Biochem. 2010;104(11):1205-13.
4. Schmitt A, Schmitt J, Munch G, Gasic-Milenkovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: Side chain modifications and fluorescence characteristics. Anal Biochem. 2005;338(2):201-15.
5. Matheson SL, Mcnamee J, Jean-Claude BJ. Design of a chimeric 3-methyl-1,2,3-triazene with mixed receptor tyrosine kinase and DNA damaging properties: a novel tumor targeting strategy. J Pharmacol Exp Ther. 2001;296(3):832-40.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Cell 2000;100:57–70.
7. Driscoll O'L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. Curr Cancer Drug Targets 2003;3:131-152.
8. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. J Allergy Clin Immunol 2001;108:S99-S103.
9. Reed JC, Dysregulation of apoptosis in cancer. J Clin Oncol. 1999;17:2941-2953.
10. Gaya AM, Rustin GJS. Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. Clin Oncol 2005; 17:277-290.

11. Mansouri-Torshizi H, Moghaddam M, Divsalar A, Saboury A. Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum (II) and palladium (II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. Bioorg Med Chem. 2008;16:9616-9625.
12. Tatyana V, Irene K, Motley M, Walmsley J. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of palladium (II)–proflavine complexes. J Inorg Biochem. 2010;107:1205–1213.
13. Divsalar A, Saboury A, Yousefi R, Moosavi-Movahedi A, Mansoori-Torshizi H. Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium (II) complexes: Lactoglobulin and K562 as the targets, International J Biol Macromol. 2007;40:381–386.
14. Shafqat N, Bolte M, Ahmad S, Fazeelat T, Tirmizi A, Rauf M, Samina A, Sadia S, Abdul hameed Haider Z. Synthesis, crystal structures and antibacterial and antiproliferative activities in vitro of palladium (II) complexes of triphenylphosphine and thioamides. Inorg Chem Acta. 2010;363:3261-3269.
15. Adibi H, Mostafaie A, Mansouri K, Chehardoli L. Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity of platinum (II) squarate. PharmD Thesis, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, January 2011, pp 59-75.