

تهیه، شناسایی و مطالعه خواص بیولوژیکی کمپلکس‌های تک‌هسته‌ای پالادیوم (II)

مشتق شده از ایلیدهای نامتقارن

سپیده سمیعی^{*}، مریم کلاهی^۲، لیلا شیرالی^۱ و سلمان کردی^۱^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۸

تاریخ تصحیح: ۹۸/۰۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۱۵

چکیده

کمپلکس‌های فلزات واسطه فسفینی به دلیل کاربرد بالقوه‌شان در تهیه ترکیبات آلی، کاتالیست‌ها، طراحی داروهای جدید ضد تومور و ضد ویروسی و ضد باکتریایی در سال‌های اخیر توجهات زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در این پژوهش، دو ایلید نامتقارن با فرمول عمومی $(Y^1), 2 (Y^2)$ ($n = 1$) باکتریایی در سال‌های اخیر توجهات زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در این پژوهش، دو ایلید نامتقارن با فرمول عمومی $(Y^1), 2 (Y^2)$ ($n = 1$) $[Ph_2P(CH_2)_n PPh_2 CHC(O)C_6H_4(m-NO_2)]$ به ترتیب از واکنش ۲-برومو-۳-نیترو استوفنون با ۲-بیس(دی‌فنیل فسفینو)متان ($dppm$) و ۲-بیس(دی‌فنیل فسفینو)تان ($dppe$) تهیه گردید. به منظور تهیه پالاداسیکلیک‌های $(n = 1 (1), 2 (2)) [PdCl_2(Ph_2P(CH_2)_n PPh_2 CHC(O)C_6H_4(m-NO_2))]$ این لیگاندها با COD (۵-سیکلوکتادیان) $[PdCl_2(COD)]$ مورد واکنش قرار گرفتند. شناسایی ترکیبات تهیه شده از طریق تکنیک‌های اسپکتروسکوپی $^1H NMR$ ، $^{31}P NMR$ ، $^{13}C NMR$ و آنالیز عنصری انجام گردید. نتایج به دست آمده کوئوردیناسیون لیگاند به فلز را از طریق کربن متین و گروه فسفین آزاد لیگاند تأیید کرد (شیوه اتصال C-P-کوئوردینه). خواص بیولوژیکی این ترکیبات با استفاده از آزمون‌های TBA ، MTT و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر روی سلول‌های سرطانی روده (Caco-2) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها بیانگر خواص ضد سرطانی ترکیبات دو ایلید نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مورد مطالعه می‌باشد. بررسی نتایج زنده‌مانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بیانگر اثر ضد سرطانی ترکیبات پالادیوم و فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده می‌باشد.

کلمات کلیدی: ایلید نامتقارن، کمپلکس پالادیوم (II)، C-P-کوئوردینه، خواص بیولوژیکی.

۱- مقدمه

تاکنون در زمینه شیمی کوئوردیناسیون فسفرایلیدها (آکیل یا آریل $R, R' = R_3P=C(H)C(O)R'$) با یون‌های فلزات واسطه تحقیقات وسیعی انجام و مستند شده است [۷-۱]. این لیگاندها به علت حضور گروه‌های عاملی مختلف در ساختار مولکولی‌شان دارای فرم‌های رزونانسی مختلفی هستند که در نتیجه هم از طریق کربن متین و هم از طریق اکسیژن گروه کربونیل با یون‌های فلزی واکنش می‌دهند. در سال‌های اخیر، مطالعات قابل‌توجهی در مورد تهیه، شناسایی و بررسی‌های ویژگی زیستی فسفرایلیدهای نامتقارن مشتق شده از دی‌فسفین‌ها به عنوان مثال با $(n = 1, 2)$

Ph₂P(CH₂)_nPPh₂C(H)C(O)R گزارش شده است [۸-۱۰]. این دسته از لیگاندها علاوه بر دو موقعیت فوق دارای یک موقعیت اضافی کوئوردیناسیون (اتم فسفر گروه فسفین آزاد PPh₂): نیز می‌باشند. بنابراین می‌توانند در شیوه‌های متنوع‌تری در اتصال با یون‌های فلزی ظاهر شوند و لذا در شیمی کوئوردیناسیون فلزات واسطه نقش کلیدی بازی می‌کنند و ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون کمپلکس‌های پایداری با یون‌های فلزی مختلف به ویژه جیوه، پالادیم (II)، پلاتین (II)، ردیم (I)، مس (I) و نقره (I) تهیه شده است [۱۱-۱۶].

متأسفانه امروزه به دلیل شیوع سرطان که عامل اصلی مرگ و میر در سرتاسر جهان است، مطالعات بر روی داروهای شیمی‌درمانی بر پایه کمپلکس‌های فلزات واسطه و اصلی به طور چشمگیری در حال پیشرفت می‌باشد. موفقیت چشمگیر یک کمپلکس معدنی به نام سیس پلاتین برای درمان سرطان به کشف بسیاری از داروهای جدید بر پایه کمپلکس‌های فلزات واسطه منجر گردید [۱۷]. در حال حاضر سیس پلاتین برای درمان سرطان سر و گردن، تخمدان و بیضه مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیس پلاتین پس از ورود به داخل سلول با یک مولکول آب یا یون هیدروکسیل به فرم هیدراته در می‌آیند و با خاصیت نوکلئوفیلی که به دست می‌آورند با نیتروژن شماره ۷ بازهای پورین DNA پیوند کووالانسی برقرار می‌کنند. این برهمکنش مانع از همانندسازی و رونویسی DNA شده و نهایتاً منجر به توقف سیکل سلولی و مرگ سلولی می‌شود. با وجود کاربرد گسترده داروهای شیمی‌درمانی بر پایه پلاتین، سمیت بالا در سیستم‌های شنوایی گوارشی مغز استخوان و همچنین قابلیت نفوذ کم در بافت‌های سرطانی علت اصلی محدودیت در استفاده از این ترکیبات بیان شده است. مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که برای کاهش اثرات جانبی داروهای پلاتین می‌توان از فلزات دیگر که اثر سمی کمتری بر روی بافت‌های سالم از خود نشان می‌دهند استفاده کرد. از این رو استفاده از فلز پالادیوم که در جدول تناوبی در گروه فلز پلاتین قرار گرفته و دارای خواص مشابه با آن است در تحقیقات مورد توجه قرار گرفت. لازم به ذکر است که یافتن داروهای جدید با کارایی بالا به عنوان روشی برای شیمی‌درمانی سرطان همواره یک زمینه تحقیقاتی جالب و مورد علاقه برای محققین است. بنابراین، در این پژوهش علاوه بر سنتز و شناسایی دو ایلید فسفر دار نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه تأثیر ضد سرطانی این ترکیبات بر روی سلول سرطانی روده مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

تمام مواد مصرفی از شرکت‌های مرک و آلدریچ خریداری گردید. کلیه طیف‌های NMR توسط دستگاه (۲۵۰ MHz) Bruker و طیف‌های IR با قرص KBr و توسط دستگاه FT-IR مدل BOME/MB102 (اسکن شده در محدوده cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰) ثبت شده‌اند. در همه طیف‌های NMR جابه‌جایی شیمیایی (δ) بر حسب ppm و ثابت کوپلاژ (J) بر حسب Hz

حاصل شده‌اند (برای بررسی ساده‌تر طیف‌های $^{31}\text{P NMR}$ و $^{13}\text{C NMR}$ اثر هیدروژن دکوپل شده است). طیف‌های IR و NMR کلیه ترکیبات در بخش اطلاعات تکمیلی آورده شده است. آنالیز عنصری ترکیبات سنتز شده توسط دستگاه آنالیز مدل Vario ELIII انجام شد. اندازه‌گیری نقطه ذوب این ترکیبات توسط دستگاه 9200 Thermo Scientific انجام شد. رده سلولی آدنوکارسینوما ایپی تلیال روده بزرگ انسانی Caco-2 (NCBI code: C139) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی یا (FBS) در فلاسک کشت سلولی 25 cm^2 (Nunc) دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور 37°C و $5\% \text{ CO}_2$ درصد کشت داده شدند.

۲-۲- تهیه ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه

۲-۲-۱- تهیه ایلید (Y^1)

۰/۲ گرم (۰/۵۲ میلی‌مول) از لیگاند دودندانه فسفر دار خالص dppm در ۳ میلی‌لیتر کلروفرم حل و محیط واکنش توسط گاز نیتروژن کاملاً اکسیژن‌زدائی گردید. به محلول به دست آمده ۰/۱۲ گرم (۰/۵۲ میلی‌مول) از کتون ۲- برومو ۳- نیترو استوفنون که قبلاً در ۵ میلی‌لیتر کلروفرم حل شده بود، اضافه گردید (نسبت ۱:۱). محلول حاصل به مدت ۴ ساعت زیر جو نیتروژن توسط یک همزن مغناطیسی در دمای اتاق همزده شد. پس از تبخیر حلال تا حجم ۲ میلی‌لیتر، دی‌اتیل‌اتر به آن اضافه و رسوب زرد کم‌رنگی حاصل در دمای اتاق خشک گردید. سپس، ۰/۲ گرم (۰/۳۱ میلی‌مول) از این رسوب را با ۰/۳۱ میلی‌مول از تری‌اتیل آمین و ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن مخلوط و به مدت ۱ ساعت بر روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق همزده شد. پس از اتمام زمان واکنش، رسوب شیری رنگ تری‌اتیل آمین هیدروبرمید به‌عنوان ناخالصی توسط کاغذ صافی از محلول موردنظر جدا گردید. محلول زیر صافی تا حجم تقریباً ۲ میلی‌لیتر تبخیر و با اضافه نمودن دی‌اتیل‌اتر سرد رسوب زردرنگی به دست آمد. این رسوب جهت محاسبه راندمان و شناسایی خشک و جمع‌آوری گردید. وزن محصول ۰/۱۴۲ گرم، نقطه ذوب 102°C و بازده واکنش ۷۱٪ می‌باشد.

Anal. Calc. for $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{P}_2$: C, ۷۲/۳۳; H, ۴/۹۷; N, ۲/۵۶. Found: C, ۷۳/۰۶; H, ۴/۸۱; N, ۳/۰۶%.

Selected IR absorption in KBr (cm^{-1}): ۱۵۱۷ ($\nu_{\text{C=O}}$). $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) $\delta_{\text{P}} = -27/63$ (d, PPh_2 , $^2J_{\text{PP}} = 63/88$); ۱۵/۳۵ (d, PCH , $^2J_{\text{PP}} = 63/58$). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) $\delta_{\text{H}} = 3/64$ (m, ۲H, CH_2); ۴/۵۳ (d, ۱H, CH , $^2J_{\text{PH}} = 18/50$); ۷/۲۶-۸/۸۷ (m, ۲۴H, Ph). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) $\delta_{\text{C}} = 23/94$ (br, CH_2); ۵۰/۵۷ (d, CH , $^1J_{\text{PC}} = 111/54$); ۱۲۳/۶۱-۱۴۰/۲۱ (Ph); ۱۸۳/۸۵ (s, CO).

۲-۲-۲- تهیه ایلید (Y²)

روش تهیه لیگاند Y² مشابه لیگاند Y¹ است فقط با این تفاوت که به جای لیگاند dpmm از ۰/۲ گرم (۰/۵ میلی‌مول) لیگاند فسفر دار خالص dppe و حلال استون استفاده گردید. وزن محصول ۰/۱۳۷ گرم، نقطه ذوب °C ۱۸۷ و بازده واکنش ۶۵٪ می‌باشد.

Anal. Calc. for C₃₄H₂₉NO₃P₂: C, ۷۲/۷۲; H, ۵/۲۱; N, ۲/۴۹. Found: C, ۷۲/۱۲; H, ۵/۲۷; N, ۲/۷۰%.

Selected IR absorption in KBr (cm⁻¹): ۱۵۲۵ (ν_{C=O}). ³¹P NMR (CDCl₃): δ_p = -۱۱/۵۰ (d, PPh₂, ³J_{PP} = ۴۴/۶۵); ۱۹/۲۴ (d, PCH, ³J_{PP} = ۵۷/۵۱). ¹H NMR (CDCl₃): δ_H = ۲/۸۶ (d, ۲H, CH₂); ۳/۱۴ (d, ۲H, CH₂); ۴/۲۲ (br, ۱H, CH); ۷/۱۶-۸/۲۵ (m, ۲۴H, Ph). ¹³C NMR (CDCl₃): δ_C = ۲۱/۵۳ (br, CH₂); ۴۷/۵۷ (d, CH, ¹J_{PC} = ۱۱۲/۵۰); ۱۲۳/۷۷-۱۳۹/۸۱ (Ph); ۱۸۳/۵۹ (s, CO).

۲-۲-۳- تهیه کمپلکس (۱) [Pd(Y¹)Cl₂]

ابتدا ۰/۰۸ گرم (۰/۱۴ میلی‌مول) از لیگاند Y¹ در ۶ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل و محیط واکنش توسط گاز نیتروژن کاملاً اکسیژن‌زدایی گردید. ۰/۰۳ گرم (۰/۱۴ میلی‌مول) از PdCl₂(COD) که در ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل شده بود به محلول قبلی اضافه و به مدت ۲ ساعت همزده شد. پس از اتمام زمان واکنش، حجم محلول تا ۲ میلی‌لیتر تبخیر و با اضافه کردن هگزان نرمال رسوب زردرنگی حاصل شد. این رسوب جهت محاسبه راندمان و شناسایی خشک و جمع‌آوری گردید. وزن محصول ۰/۰۸۷ گرم، نقطه ذوب °C ۱۴۵ و بازده واکنش ۷۹٪ می‌باشد.

Anal. Calc. for C₃₃H₂₇Cl₂NO₃P₂Pd: C, ۵۴/۶۸; H, ۳/۷۵; N, ۱/۹۳ Found: C, ۵۴/۰۳; H, ۴/۱۰; N, ۱/۸۷%. Selected IR absorption in KBr (cm⁻¹): ۱۶۱۴ (ν_{C=O}). ³¹P NMR (DMSO-d₆): δ_p = ۲۸/۳۹ (br, PPh₂); ۳۸/۹۴ (d, PCH, ²J_{PP} = ۴۷/۱۶ Hz). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ_H = ۴/۶۹ (b, CH₂); ۶/۱۵ (br, CH); ۷/۳۹-۸/۲۲ (m, ۲۴H, Ph). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ_C = ۲۳/۲۴ (br); ۳۴/۱۴ (br, CH); ۱۱۹/۱۷-۱۳۷/۸۴ (Ph); ۱۹۲/۱۶ (s, CO).

۲-۲-۴- تهیه کمپلکس (۲) [Pd(Y²)Cl₂]

روش تهیه کمپلکس ۲ مشابه کمپلکس ۱ است فقط با این تفاوت که به جای لیگاند Y² از ۰/۱ گرم (۰/۱ میلی‌مول) لیگاند Y² استفاده گردید. وزن محصول ۰/۰۶ گرم، نقطه ذوب °C ۱۵۷ و بازده واکنش ۷۰٪ می‌باشد.

Anal. Calc. for C₃₄H₂₉Cl₂NO₃P₂Pd: C, ۵۵/۲۷; H, ۳/۹۶; N, ۱/۸۹. Found: C, ۵۵/۸۷; H, ۴/۲۰; N, ۱/۶۷%. Selected IR absorption in KBr (cm⁻¹): ۱۶۳۳ (ν_{C=O}). ³¹P NMR (CDCl₃) δ_p = ۲۳/۷۳ (bd,

PCH); ۳۱/۲۹ (bd, PPh₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ_H = ۳/۰۷ (br, ۲H, CH₂); ۳/۵۱ (br, ۲H, CH₂); ۶/۲۹ (br, ۱H, CH); ۷/۱۹-۸/۶۳ (m, ۲۴H, Ph). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ_C = ۱۸/۴۱ (br, CH₂); ۱۲۳/۹۷-۱۳۷/۳۳ (Ph); ۱۹۵/۱۷(s, CO).

۳-۲- مطالعه اثرات ضد سرطانی ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه

۳-۲-۱- بررسی تیمار و سمیت با روش MTT assay

به منظور بررسی اثر این ترکیبات بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نا محلول بنا شده است. جهت انجام آزمایش، سلول‌های سرطانی روده (Caco-2) در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه ۱۰^۳ × ۴ سلول در حجم ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شد. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C، محیط کشت سلول‌ها با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ایلیدهای فسفر دار و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه تیمار شدند. از محلول MTT (غلظت ۵ mg/ml)، ۲۰ میکرو لیتر در هر خانه ریخته شد. بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C، محلول رویی حذف و ۱۵۰ میکرولیتر حلال MTT (۱۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول و ۲۰ μL HCl) اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، توسط دستگاه خوانش الیزا جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۰ nm اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شده و درصد زنده ماندن سلولی با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد زنده ماندنی} = (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد ممانعت کنندگی} = \text{درصد سلول‌های زنده} - ۱۰۰$$

۳-۲-۲- اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی به روش MDA

مالون دی آلدهید در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب در سلول‌ها تولید می‌شود که وقتی در معرض تیوباربیتوریک اسید (TBA) قرار می‌گیرد، تشکیل کمپلکس (TBA-MDA) می‌دهد و در نمونه‌ها قابل تشخیص است. به منظور انجام این آزمون، سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و به مدت ۲۴ با ترکیبات ذکر شده (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۱۵۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد. پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری تشکیل سوپستراهای واکنشی تیوباربیتوریک اسید تعیین شد. جهت انجام این آزمون به ۵۰ میکرو لیتر از نمونه سلولی لیز شده، ۱۰۰ میکرو لیتر فسفات بافر سالین، ۱۰ میکرو لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ و ۱۰ میکرو لیتر تیوباربیتوریک اسید ۶٪ افزوده گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه جوشانده و جذب آن

در ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. مقدار مالون دی آلدئید بر اساس منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف تتراتوکسی پروپان در آب محاسبه گردید. به منظور تهیه غلظت اولیه ۱ میلی‌مولار، ۲۵ میکرو لیتر از محلول ۱، ۱، ۳، ۳، ۳ تتراتوکسی پروپان ۰/۹۹٪ (سیگما، آلمان) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول فوق به منظور تولید مالون دی آلدئید در ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد مخلوط و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. با توجه به اینکه در استاندارد تهیه شده MDA ۲۰ nmol/ml وجود داشت، رقت سازی به منظور تهیه استانداردهای ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ نانو مول در میلی‌لیتر با استفاده از اسیدسولفوریک یک درصد انجام شد. منحنی استاندارد MDA بر اساس قرائت جذب نمونه‌های استاندارد در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) رسم گردید. به منظور محاسبه مقادیر MDA در نمونه‌های سلولی پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و قرائت جذب آن‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر مقدار MDA بر حسب نانو مول در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

۲-۳-۳- سنجش سوپراکسید دیسموتاز

به منظور انجام این ارزیابی، سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و به مدت ۲۴ با ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۱۵۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سلول‌ها توسط کیت تجاری سوپراکسید دیسموتاز (پارس آزمون، ایران) بررسی شد. در این روش، گزانتین در حضور آنزیم گزانتین اکسیداز تولید رادیکال آزاد سوپراکسید می‌نماید که پس از واکنش با کروموزن INT ایجاد رنگ قرمز فرمازان می‌نماید. در صورت وجود آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نمونه‌ها واکنش رنگی مهار می‌شود. یک واحد فعالیت آنزیم SOD معادل مقداری از آنزیم است که سبب ۵۰ درصد مهار در احیا INT و تولید رنگ شود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد. به منظور محاسبه فعالیت آنزیم ابتدا منحنی استاندارد تغییرات درصد مهار در مقابل تغییرات جذب نمونه‌های استاندارد در طول موج ۵۰۵ نانومتر رسم و بر اساس نمودار خط و تغییرات جذب نمونه‌های مجهول درصد مهار محاسبه گردید. بر اساس واحد فعالیت آنزیم (یک واحد معادل ۰/۵٪ مهار) فعالیت تام آنزیم در میلی‌لیتر محاسبه گردید و با تقسیم مقدار به دست آمده بر میزان پروتئین فعالیت آنزیم بر اساس IU/mg پروتئین محاسبه و گزارش گردید.

۲-۳-۴- سنجش کاتالاز

در ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت با لیگاند‌های فسفر دار و کمپلکس‌های پالادیوم مربوطه با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۱۵۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد. به منظور ارزیابی فعالیت کاتالاز سلول‌ها، از روش کینتیک تخریب پراکسید

هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. یک واحد آنزیم معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرو مول H_2O_2 را در مدت یک دقیقه تخریب کند. برای سنجش کاتالاز از محلول‌هایی شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (به منظور تهیه این محلول، مقدار ۱/۱۴ میلی‌گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و pH آن روی ۷ تنظیم شد) و پراکسید هیدروژن ۰/۰۳۶٪ (به منظور تهیه این محلول، پراکسید هیدروژن ۳۰٪ در بافر فسفات تهیه شده رقیق گردید) استفاده شد. یک واحد کاتالاز به عنوان مقدار آنزیم موردنیاز برای تجزیه ۱ میکرومولار پراکسید هیدروژن در ۱ دقیقه تعریف شده است. این واکنش با افزودن ۲۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن تازه تهیه شده (۱ میکرو لیتر) آغاز شد. میزان تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم برحسب IU/mg پروتئین گزارش گردید.

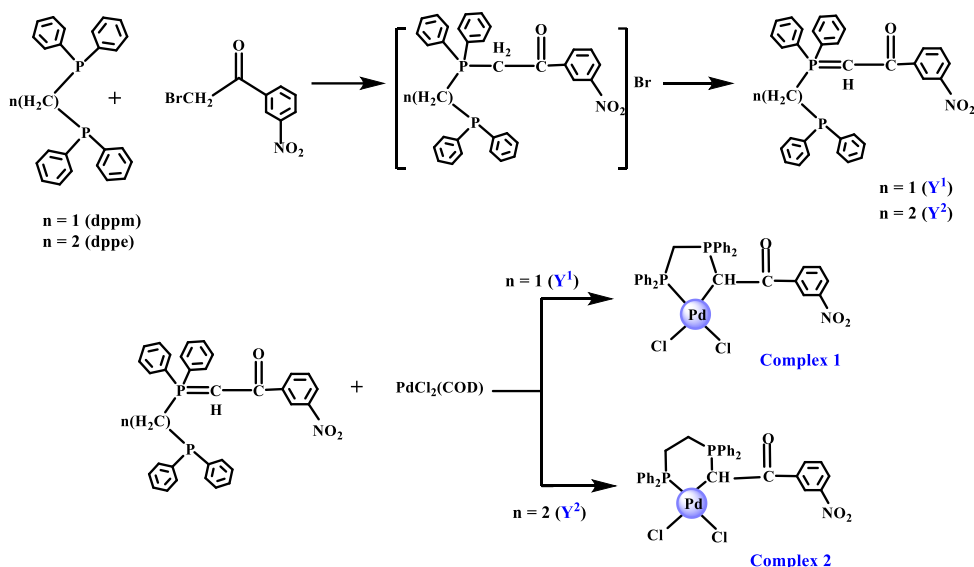
۲-۳-۵- سنجش پروتئین

به منظور انجام این تست، سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت با ترکیبات ذکر شده با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۱۵۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد. اندازه‌گیری محتوی پروتئین سلول‌ها با استفاده از سنجش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معین پروتئین استفاده و جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید. آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS انجام و نمودارهای مقایسه میانگین با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

۳- بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱- تهیه و شناسایی ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه

در ابتدا این پژوهش، سنتز و شناسایی دو فسفرایلیدهای نامتقارن مشتق شده از دی‌فسفین‌های dppm و dppe مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس شکل (۱)، از واکنش ۲-برومو-۳-نیترواستوفنون با دی‌فسفین موردنظر به نسبت ۱:۱ در دمای اتاق تحت جو نیتروژن نمک منوفسفونیوم حاصل و سپس در مرحله بعد هیدروژن اسیدی موقعیت α نمک به وسیله تری‌اتیل آمین خنثی و فسفرایلید نامتقارن مورد نظر (Y^1 و Y^2) حاصل شد. کلیه لیگاندهای سنتز شده با استفاده از تکنیک‌های IR، NMR و آنالیز عنصری مورد شناسایی قرار گرفتند. سنتز این لیگاندها در طیف‌های IR با حضور نوار قوی گروه کربونیل در محدوده cm^{-1} ۱۵۰۰ و فرکانس مربوط به گروه (P-C) در محدوده cm^{-1} ۸۰۰ تأیید می‌شود. همچنین حضور دو دسته پیک مربوط به دو گروه فسفونیوم (PCH_2) و فسفین آزاد (PPh_2) در طیف‌های ^{31}P NMR تشکیل ایلیدهای نامتقارن Y^1 و Y^2 را تأیید می‌کند.



شکل ۱- مراحل تهیه ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه

در ادامه از واکنش ایلیدهای نامتقارن Y^1 و Y^2 با $PdCl_2(COD)$ در حلال هگزان نرمال (نسبت ۱:۱) به ترتیب کمپلکس‌های پالادیوم پنج عضوی (۱) و شش عضوی (۲) تهیه شد (شکل (۱)). بخشی از داده‌های مهم اسپکتروسکوپی که سنتز کمپلکس‌های پالادیوم (۱) و (۲) را تأیید می‌کند، به صورت خلاصه در جدول (۱) گردآوری شده است. نتایج حاصل از طیف‌های NMR و IR تشکیل دو کمپلکس‌های پالادیوم (II) را تأیید می‌کند. علاوه بر این آنالیز عنصری هم نسبت استوکیومتری ۱:۱ را بین ایلید و پالادیوم کلراید (II) نشان می‌دهد. در طیف‌های ^{31}P NMR کمپلکس ۱ و ۲، پیک مربوط به رزونانس اتم فسفر گروه فسفونیوم (PCH) به صورت یک پیک دوتایی و در میدان‌های پایین‌تر نسبت به ایلیدهای مربوطه (Y^2 و Y^1) ظاهر شده است. علت این امر را می‌توان به اتصال کربن متین لیگاند به هسته فلز پالادیوم و در نتیجه کاهش چگالی الکترون روی این اتم فسفر نسبت داد. همچنین از جابه‌جایی قابل‌ملاحظه پیک مربوط به رزونانس اتم فسفر گروه فسفین آزاد (PPh_2): به سمت میدان‌های پایین‌تر در مقایسه با همان پیک در لیگاند آزاد اتصال فسفر گروه فسفین به هسته فلز قابل تأیید است. بر طبق داده‌های جدول ۱، در طیف‌های 1H NMR کمپلکس (۱) و (۲) رزونانس مربوط به پروتون گروه CH به صورت یک پیک پهن مشاهده می‌شود که نسبت به ایلیدهای مربوطه (Y^2 و Y^1) در میدان پایین‌تری ظاهر شده است. این مطلب نشانگر کوئوردینه شدن ایلید به فلز از طریق کربن متین و کاهش چگالی الکترون بر روی CH است. همچنین در طیف‌های ^{13}C NMR رزونانس کربن گروه کربونیل کمپلکس (۱) و (۲) نسبت به لیگاند در میدان پایین‌تری ظاهر می‌شود. علت این امر را می‌توان به کوئوردینه شدن ایلید به فلز از طریق کربن متین و کاهش چگالی الکترون روی اتم کربن گروه کربونیل نسبت داد. علاوه بر این، در طیف‌های IR کوئوردینه شدن از طریق کربن متین با افزایش فرکانس $\nu(CO)$ در کمپلکس (۱) و (۲) نسبت به لیگاند مربوطه مشاهده می‌شود. بنابراین با توجه به جابه‌جایی شیمیایی هر دو اتم فسفر (گروه

فسفونیم و فسفین آزاد)، پروتون مربوط به گروه CH، کربن گروه کربونیل در طیف‌های NMR و افزایش فرکانس $\nu(\text{CO})$ در IR کوئوردینه شدن از طریق کربن متین و فسفر مربوط به گروه فسفین ایلید به فلز پالادیوم و نهایتاً شیوه اتصال P,C- کوئوردینه قابل پیش‌بینی و تأیید است. لازم به ذکر است که این نتایج با کمپلکس‌های P,C- کوئوردینه مشابه مانند $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\text{CHC}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_4\text{R}]$ ($n = 1, 2$; $\text{R} = p\text{-Cl}, p\text{-Br}, p\text{-NO}_2, p\text{-OCH}_3$) همخوانی کامل دارد [۱۶، ۱۰-۸، ۶].

جدول ۱. داده‌های حاصل از اسپکتروسکوپی ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) تهیه شده.*

ترکیب	IR		NMR		
	$\nu(\text{CO})$	δPCH ($^2J_{\text{PH}}$)	δPPh_2 ($^2J_{\text{PP}}$)	δPCH ($^2J_{\text{PP}}$)	δCO
Y ¹	۱۵۱۷	۴/۳۵ (۱۸/۰۵)	-۲۷/۶۳ (۶۳/۸۸)	۱۵/۳۵ (۶۳/۵۸)	۱۸۳/۸۵
Complex 1	۱۶۱۴	۶/۱۵ (br)	۲۸/۳۹ (br)	۳۸/۹۴ (۴۷/۱۶)	۱۹۲/۱۶
Y ²	۱۵۲۵	۴/۲۲ (br)	-۱۱/۵۰ (۴۴/۶۵)	۱۹/۲۴ (۵۷/۵۲)	۱۸۳/۵۹
Complex 2	۱۶۳۳	۶/۲۹ (br)	۲۳/۷۳ (bd)	۳۱/۲۹ (bd)	۱۹۵/۱۷

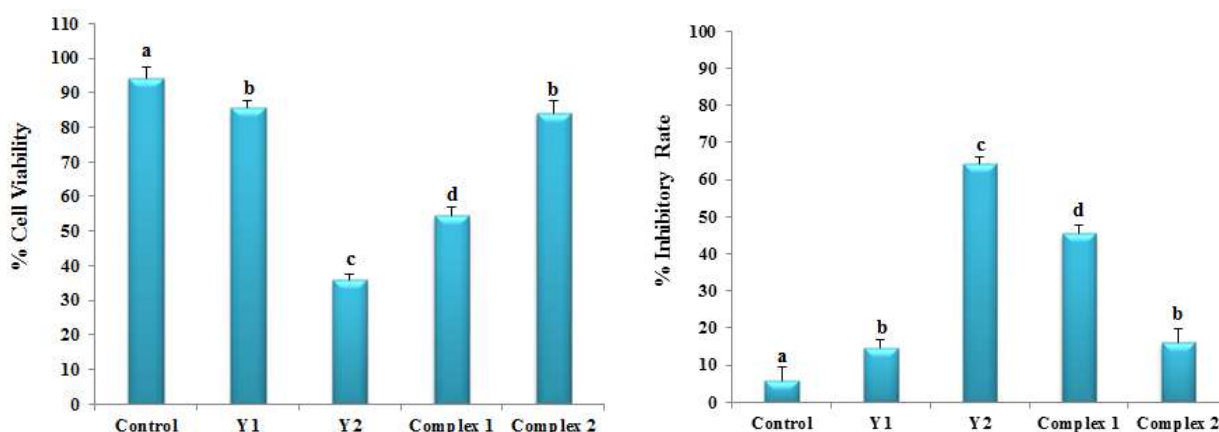
*جابه‌جایی شیمیایی (δ) برحسب ppm، ثابت کوپلاز (J) برحسب Hz و فرکانس (ν) برحسب cm^{-1} گزارش شده است.

۳-۲- مطالعه اثر ضدسرطانی ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه

۳-۲-۱- ارزیابی میزان زنده‌مانی و ممانعت‌کنندگی سلولی

بر اساس نتایج آزمون MTT، نتایج ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی Caco-2 تحت تیمار با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه به مدت ۲۴ ساعت، در شکل (۲) آمده است. بر اساس این نتایج میزان زنده‌مانی این سلول‌ها در پنج گروه شاهد و تیمارها تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. لیگاندهای (Y¹) و (Y²) و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه میزان زنده‌مانی را نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهند. کمپلکس (۱) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y¹) زنده‌مانی سلولی کمتری دارد، در حالی که کمپلکس (۲) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y²) زنده‌مانی سلولی بیشتری دارد. کمترین میزان سمیت سلولی مربوط به لیگاندهای (Y¹) و کمپلکس (۲) است که میزان زنده‌مانی را به طرز معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش می‌دهند. برای ترکیبات مورد مطالعه به ویژه لیگاند (Y²) نسبت به گروه شاهد ممانعت‌کنندگی به مراتب بیشتری وجود دارد. کمپلکس پالادیوم (۱) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y¹) ممانعت‌کنندگی بیشتری از رشد سلول‌های سرطانی Caco-2 به وجود می‌آورد، ولی کمپلکس پالادیوم (۲) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y¹) به طور معناداری اثر ممانعت‌کنندگی کمتری بر روی سلول‌های سرطانی روده نشان می‌دهد. از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که لیگاند فسفر دار مشتق شده از dppe یعنی لیگاند (Y²) نسبت به سایر ترکیبات تهیه شده از توان سیتوتوکسی بیشتری در مواجهه با سلول‌های سرطانی روده برخوردار است (شکل ۱، $p < 0.05$). لازم به ذکر است که فعالیت سیتوتوکسی ترکیبات شیمیایی به طور قابل توجهی به ساختار آن‌ها بستگی دارد. بر پایه تحقیقات انجام شده برای کمپلکس‌های پالادیوم (II) [۱۸-۲۲]، حضور لیگاندهای با اتم دهنده فسفر و

گروه‌های حجیم آروماتیک مانند PPh₂، حلقه‌های پایدار پنج یا شش عضوی و ساختار مسطح مربع می‌تواند منجر به افزایش برهمکنش‌های مؤثر با DNA و توان سیتوتوکسی شود. هم‌راستا با نتایج ما، صابونچی و همکاران تعدادی کمپلکس‌های P,C-کوئوردینه پالادیوم (II) با لیگاندهای فسفر دار مشابه سنتز و کارایی آن‌ها را برای چندین رده سلولی تومور انسانی از جمله HT29 (سلول سرطانی دهانه روده)، A2780 (سلول سرطانی ملانوما پوست)، U87 MG (سلول سرطانی مغز)، H1299 (سلول سرطانی شش)، KB (سلول سرطانی پاپیلوماویروس)، HeLa (سلول سرطانی دهانه رحم) و MCF-7 (سلول سرطانی سینه) مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که این ترکیبات دارای فعالیت سیتوتوکسی قابل توجهی بوده و پتانسیل کاربرد به عنوان داروهای ضد سرطان را دارا می‌باشند [۲۵-۲۳، ۶]. لازم به ذکر است که ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق نسبت به کمپلکس‌های P,C-کوئوردینه پالادیوم (II) گزارش شده از سمیت قابل قبولی برخوردار هستند. همچنین در یک تحقیق دیگر که توسط Spencer و همکارانش انجام شد [۲۶]، با استفاده از روش MTT فعالیت سایتوتوکسیک تعدادی از کمپلکس‌های پالادیوم (II) حاوی لیگاند دی‌فسفین dppe بر سلول سرطانی A2780/S ارزیابی گردید. مطالعات نشان داد که خصلت چربی‌دوستی این دسته از کمپلکس‌های پالادیوم به حضور دو گروه حجیم دی‌فنیل‌فسفین (PPh₂) مرتبط بوده و در نهایت انتقال از غشاهای سلولی را تسهیل می‌کند. همچنین در ادامه کرمی و همکارانش [۲۷، ۲۸] نقش لیگاند فسفر دار را در افزایش ماهیت سایتوتوکسیک کمپلکس‌های پالادیوم نشان دادند که در تائید نتایج حاصل از این تحقیق می‌باشد.



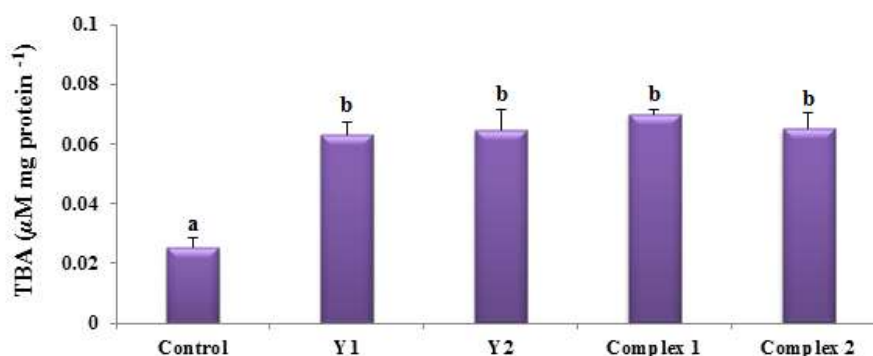
شکل ۲- الف) میزان زنده‌مانی و ب) میزان ممانعت‌کنندگی سلول‌های Caco-2 تیمار شده با ترکیبات ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II). حروف قرار داده‌شده در روی هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند.

۳-۲-۲- بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی

یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع فعال اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی‌آلدئید (MDA) و ترکیباتی مانند اتیلن می‌گردد [۲۹]. اثر رادیکال‌های اکسیژن بر لیپیدها و پراکسیداسیون آن‌ها ناشی از اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که واکنش‌های زنجیره‌ای

پراکسیداسیون را تحریک کرده و منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند. رادیکال‌های هیدروکسیل و یا اکسیژن یکتایی با گروه‌های متیلن اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده و تولید رادیکال‌های پراکسی و هیدرو پراکسی لیپید می‌کنند. در طی پراکسیداسیون لیپیدی چندین محصول تولید می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها مالون دی آلدهید است که از طریق تست تیوباربتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری می‌گردد. بر اساس نتایج تست TBA، نتایج ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های سرطانی Caco-2 تحت تیمار با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه به مدت ۲۴ ساعت در شکل (۳) آمده است. بر اساس این نتایج میزان پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های سرطانی Caco-2 در گروه شاهد و تیمار تفاوت معناداری را نشان داد. مقایسه این ترکیبات با هم نشان می‌دهد که تفاوت معناداری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی با هم ندارند و همه ترکیبات مورد مطالعه با توان بالایی می‌توانند باعث تخریب غشای سلول‌های سرطانی شوند (شکل ۳، $p < 0.05$). تاکنون، پژوهش‌های انجام‌شده از سوی محققان نشان می‌دهد که داروها و ترکیبات با خاصیت ضد سرطان مانند سیس پلاتین باعث القاء پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلول‌های سرطانی نیز می‌شوند [۳۰]. در همین ارتباط، کمپلکس‌هایی با هسته فلز پالادیوم هم با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند و از آن‌ها به عنوان اثرات متفاوت آنتی‌اکسیدان‌ها و به دام اندازی رادیکال‌های آزاد یاد می‌کنند [۳۱]. اخیراً در همین راستا گروهی از محققان نشان دادند که کمپلکس‌های پالادیوم (II) مشابه با کمپلکس‌های حاضر در این تحقیق با فرمول عمومی $[Pd(sac)_2(diphos)] = sac$ ساختارینات، $diphos =$ لیگاندهای دی فسفینی مانند $dppm$ و $dppe$ می‌تواند سبب القای آپوپتوز و مرگ سلولی نیز گردند [۳۲]. از آنجا که آپوپتوز یک مکانسیم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن است و با توجه به این‌که اختلال در این فرایند به عنوان یک عامل مهم در ایجاد و پیشرفت سرطان به شمار می‌آید، لذا کمپلکس‌های جدید پالادیوم می‌تواند در القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی حائز اهمیت باشند [۳۲]. در مقایسه با نتایج ما صابونچی و همکاران در سال ۲۰۱۸ با مطالعه کمپلکس‌های Pd/Pt به عنوان ترکیباتی با خاصیت شیمی‌درمانی نشان دادند که این ترکیبات دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه با ویتامین C هستند و این ویژگی موجب تخریب غشاء پلاسمایی در سلول‌های سرطانی می‌شود [۲۴]. در پژوهشی دیگر توسط کانوویک و همکاران مشخص شد ترکیبات با هسته فلزی از جمله پالادیوم موجب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش مرگ سلولی می‌شوند. همچنین در بررسی دقیق‌تر نشان داده شد که پالادیوم باعث افزایش رادیکال آنیون در سلول‌های سرطانی روده (HCT-116) و باعث القاء پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد [۳۳]. در یک تحقیق موافق با مطالعه حاضر که توسط آلاریفی و همکاران انجام شد، ترکیبات پالادیوم را موجب آپوپتوز و مرگ سلول‌های بدخیم ملانوما پوست (A375) انسان نشان دادند. به طوریکه این ترکیبات با القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی‌ها تیمار شده باعث افزایش گونه‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. تغییرات ایجادشده در سلول‌ها موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آپوپتوز در سلول‌های

سرطانی A375 می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی غشاء پلاسمایی، یکی از مراحل اولیه تخریب اکسیداتیو است. در سلول‌های A375 در معرض ترکیبات پالادیوم به طرز معنی‌داری افزایش سطح مالون دی‌آلدهید درون سلول دیده شد که بیانگر پتانسیل این ترکیبات برای القاء استرس اکسیداتیو است. همین مطالعه نشان داد که ترکیبات پالادیوم با القاء استرس اکسیداتیو باعث افزایش سایر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در سلول‌های A375 می‌شوند [۳۴].

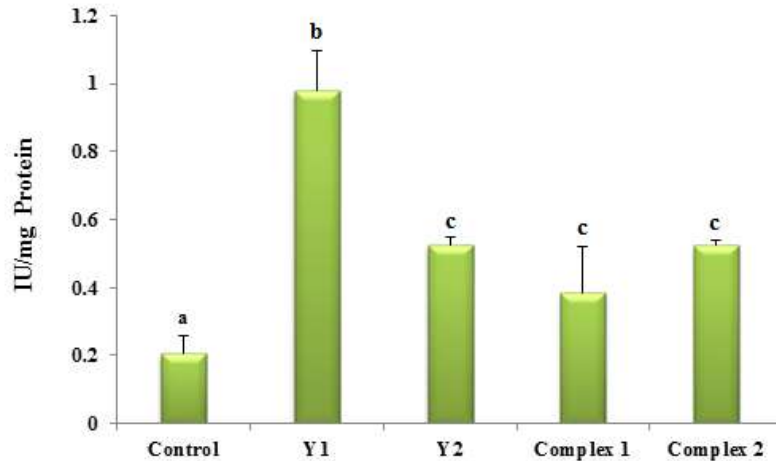


شکل ۳- میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های سرطانی Caco-2 تیمار شده با ترکیبات ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II). حروف قرار داده‌شده در روی هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

۳-۲-۳- ارزیابی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های تحت تیمار با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه به مدت ۲۴ ساعت در شکل ۴ آمده است. تیمار سلول‌های Caco-2 سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گردید. حداکثر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در لیگاندهای (Y¹) مشاهده شد. علی‌رغم افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با لیگاندهای (Y²)، کمپلکس (۱) و کمپلکس (۲) نسبت به گروه کنترل، میزان فعالیت آنزیم در این سه گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۵، $p < 0.05$). افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با بیانگر القا سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تحت تیمار با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه می‌باشد. در اینجا بایستی خاطر نشان کرد که در سال‌های اخیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز همراه با افزایش مالون دی‌آلدهید در سلول‌های سرطانی تیمار شده با ترکیبات شیمیایی با هسته فلزی گزارش شده است [۳۶، ۳۵]. هم‌راستا با یافته‌های ما، آلاریفی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که رده سلولی سرطان پوست (A375) در معرض ترکیبات پالادیوم به طرز معنی‌داری افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به عنوان یک سیستم دفاعی در برابر حمله رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهند [۳۴]. نتایج گروناتان و همکاران نشان داد که افزایش غلظت ترکیبات پالادیوم باعث کاهش زنده ماندنی و افزایش سمیت سلولی در سلول‌های سرطان تخمدان انسان

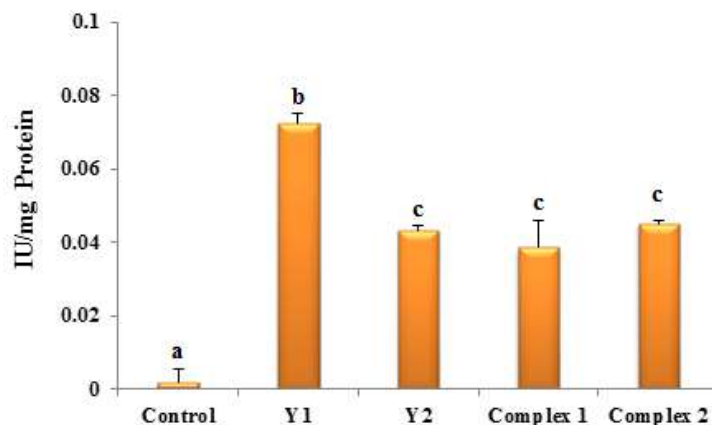
(SKOV3) می شوند، که با افزایش سطح گونه های اکسیژن واکنش پذیر و مالون دی آلدهید و از طرفی تغییر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز همراه است [۳۷].



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول های سرطانی Caco-2 تیمار شده با ترکیبات ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس های پالادیوم (II). حروف قرار داده شده در روی هر ستون بیان گر اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/05$ می باشد.

۳-۲-۴- ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز

تیمار سلول های Caco-2 با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه به مدت ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در لیگاندهای (Y¹) مشاهده شد. علی رغم افزایش معنی دار فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول های تیمار شده با لیگاندهای (Y²), کمپلکس (۱) و کمپلکس (۲) نسبت به گروه کنترل، میزان فعالیت آنزیم در این سه گروه با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۵، $p < 0/05$). افزایش معنی دار فعالیت آنزیم کاتالاز با الگوی مشابه در آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول های تیمار شده با دو لیگاند و کمپلکس پالادیوم (II) مربوطه تائید کننده فعال شدن القای سیستم آنتی اکسیدانی در سلول های تحت تیمار توسط ترکیبات مورد بررسی هست. بررسی ها نشان می دهد که این ترکیبات همانند داروهای ضد سرطان شناخته شده (مانند سیس پلاتین، اگزالی پلاتین و کاربوپلاتین) باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می شوند [۳۸-۴۰].



شکل ۵- ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های سرطانی Caco-2 تیمار شده با ترکیبات ایلیدهای نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II). حروف قرار داده شده در روی هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

۴- نتیجه‌گیری

ترکیبات پالادیوم یکی از جایگزین‌های مناسب به جای ترکیبات پلاتین به عنوان داروهای شیمی‌درمانی است. بنابراین، با وجود اهمیت این موضوع در شیمی‌درمانی، در این پروژه به سنتز، شناسایی و بررسی خواص ضد سرطانی دو ایلید نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II) مربوطه پرداخته شد. شناسایی کلیه ترکیبات از طریق تکنیک‌های اسپکتروسکوپی ^{31}P NMR، ^1H NMR، ^{13}C NMR، IR و آنالیز عنصری انجام شد. نتایج به دست آمده تشکیل کمپلکس‌های پالادیوم را به شیوه اتصال C,P-کوئوردینه و ایجاد حلقه‌های پنج و شش عضوی را تأیید کرد. بررسی آزمون‌های MTT، TBA و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های سرطانی روده (Caco-2) تیمار شده با ترکیبات دو ایلید نامتقارن و کمپلکس‌های پالادیوم (II)، بیانگر خواص ضد سرطانی این ترکیبات می‌باشد. کمپلکس پالادیوم (1) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y^1) ممانعت‌کنندگی بیشتر درحالی‌که کمپلکس پالادیوم (2) در مقایسه با لیگاند مربوطه (Y^1) اثر ممانعت‌کنندگی کمتری بر روی سلول‌های سرطانی روده نشان داد. بررسی میزان پراکسیداسیون غشایی بیانگر توان بالای این ترکیبات برای تخریب غشای سلول‌های سرطانی بود. نتایج بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در سلول‌های تیمار شده نشان داد، بیشترین فعالیت هر دو آنزیم در تیمارهای لیگاندهای (Y^1) دیده شد که تأیید کننده نتایج زنده‌مانی می‌باشد. بررسی نتایج زنده‌مانی و فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های تیمار شده نشان می‌دهد که احتمالاً اثر ضد سرطانی ترکیبات مورد مطالعه به دلیل فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده توسط ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۶- مراجع

- [1] O. I. Kolodiazhnyi, *Russ. Chem. Rev.*, **66** (1997) 1855.
- [2] E. P. Urriolabeitia, *Dalton Trans.*, 2008, 5673.
- [3] E. P. Urriolabeitia, *Top. Organomet. Chem.*, **30** (2010) 15.
- [4] L. R. Falvello, S. Fernandez, R. Navarro, E. P. Urriolabeitia, *Inorg. Chem.*, **39** (2000) 2957.
- [5] W. Philip, T. Scherpf, I. Rodstein, D. Lichte, T. Scharf, J. L. Gooßen, V. Gessner, *Angew. Chem.*, **58** (2019) 3203.
- [6] S. J. Sabounchei, M. Hosseinzadeh, S. Salehzadeh, F. Maleki, R. W. Gable, *Inorg. Chem. Front.*, **4** (2107) 2118.
- [7] P. Chen, Z.C. Chen, Y. Li, Q. Ouyang, W. Du, Y.C. Chen, *Angew. Chem.*, **58** (2019) 4036.
- [8] Y. Oosawa, H. Urabe, T. Saito, Y. Sasaki, *J. Organomet. Chem.*, **122** (1976) 113.
- [9] S. J. Sabounchei, S. Samiee, D. Nematollahi, A. Naghipour, D. Morales-Morales, *Inorg. Chim. Acta*, **363** (2010) 3973.
- [10] M. M. Ebrahima, K. Panchanatheswaran, A. Neels, H. Stoeckli-Evans, *J. Organomet. Chem.*, **694** (2009) 643.
- [11] S. J. Sabounchei, A. Dadrass, M. Jafarzadeh, S. Salehzadeh, H. R. Khavasi, *J. Organomet. Chem.*, **692** (2007) 2500.
- [12] L. Tusek-Bozic, M. Juribasic, P. Traldi, V. Scarzia, A. Furlani, *Polyhedron*, **27** (2008) 1317.
- [13] S. M. Nabavizadeh, M. Aseman Dadkhah, B. Ghaffari, M. Rashidi, F. Niroomand Hosseini, G. Azimi, *J. Organomet. Chem.*, **715** (2012) 73.
- [14] P. Zatsepin, S. Ahn, B. Pudasaini, M. Gau, M.H. Baik, D. Mindiola, *Chem. Comm.*, **55** (2019) 1927.
- [15] K. Karami, M. Rahimi, M. Zakariazadeh, O. Buyukgungor, S.A. Esmaeili, *J. Mol. Struct.*, **1177** (2019) 430.
- [16] S. J. Sabounchei, M. Pourshahbaz, A. Hashemi, M. Ahmadi, R. Karamian, M. Asadbegy, H. R. Khavasi, *J. Organomet. Chem.*, **761** (2014) 111.
- [17] B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, *Nature*, **205** (1965) 697.
- [18] A.G. Quiroga, C.N. Ranninger, *Coord. Chem. Rev.*, **248** (2004) 119.
- [19] J. Dupont, C.S. Consorti, J. Spencer, *Chem. Rev.*, **105** (2005) 2527.
- [20] M. Ghedini, I. Aiello, A. Crispini, A. Golemme, M. La Deda, D. Pucci, *Coord. Chem. Rev.*, **250** (2006) 1373.
- [21] M. P. M. Marques, *ISRN Spectroscopy*, **2013** (2013) 1.
- [22] N. T. Abdel, G. Ahmed, M. Mansour, *Eur. J. Med. Chem.*, **47** (2012) 399.
- [23] S. J. Sabounchei, K. Badpa, A. Hashemi, S. Salehzadeh, F. Maleki, L. Hosseinzadeh, *Appl. Organometal. Chem.*, (2018) e4382.

- [24] S. J. Sabounchei, K. Badpa, D. Nematollahi, M. Sharafi-kolkeshvandi, L. Hosseinzadeh, R.Karamian, F. Ghasemlou, R. W. Gabl, *New J. Chem.*, **42** (2018) 8968.
- [25] S. J. Sabounchei, M. Sayadi, A. Hashemi, S. Salehzadeh, F. Maleki, D. Nematollahi, B.Mokhtari, L. Hosseinzadeh, *J. Organomet. Chem.*, **860** (2018) 49.
- [26] J. Spencer, A. Casini, O. Zava, R. P. Rathnam, S. K. Velhanda, M. Pfeffer, S. K. Callear, M. B. Hursthouse, P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, **48** (2009) 10731.
- [27] K. Karami, M. H. kharat, H. Sadeghi-Aliabadi, J. Lipkowski, M. Mirian, *Polyhedron*, **50** (2012) 187.
- [28] K. Karami, M. H. kharat, H. Sadeghi-Aliabadi, J. Lipkowski, M. Mirian, *Eur. J. Med. Chem.*, **73** (2014) 8.
- [29] B. Yan, Q. Dai, X. Liu, S. Huang, Z. Wang, *Plant and Soil*, **179** (1996) 261.
- [30] G. Kadikoylu, Z. Bolaman, S. Demir, M. Balkaya, N. Akalin, Y. Enli, *Hum Exp Toxicol*, **23** (2004) 29.
- [31] H. J. Knölker, K. R. Reddy, A. Wagner, *Tetrahedron Letters*, **39** (1998) 8267.
- [32] C. Icsel, V. T. Yilmaz, M. Aygun, B. Cevatemre, P. Alperd, E. Ulukayad, *Dalton Trans.*, **47** (2018) 1397.
- [33] P. Canovic, J. Bogojeski, J. Kosaric, S. Markovic, M. Zivanovic, **41** (2017) 141.
- [34] S. Alarifi, D. Ali, S. Alkahtani, R. S. Almeer, *Oxid Med Cell Longev.*, **2017** (2017) 1.
- [35] K. Golchin, J. Golchin, S. Ghaderi, N. Alidadiani, S. Eslamkhah, M. Eslamkhah, S. Davaran, A. Akbarzadeh. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **46** (2018) 250.
- [36] B. Yang, Y. Chen, J. Shi, *Chem. Rev.*, **119** (2019) 4881.
- [37] S. M. Gurunathan, C. H Qasim, M. Park, H. A. Iqbal, J. Yoo, H. Hwang, S. J Uhm, H. Song, C. Park, Y. Choi, J. H. Kim, K Hong, *Nanomaterials (Basel)*, **22** (2019) 9.
- [38] H. Jörg, K. Baumann. , *Toxicology*, **51** (1988) 119.
- [39] S. Dasari, P. B. Tchounwou, *Eur J Pharmacol.*, **740** (2014) 364.
- [40] S. Shibuya, Y. Ozawa, K. Watanabe, N. Izuo, T. Toda, K. Yokote, T. Shimizu, *PLOS One.*, **9** (2014) e109288.