

مطالعه برهم‌کنش DNA تیموس گاوی با کمپلکس رنیم (I) تری‌کربونیل با لیگاند شیف‌باز دودندانه با روش‌های متفاوت طیف‌سنجی

مریم بردبار^{۱*}، فریبا طاووسی^۲، علی یگانه فعال^۳ و اکبر رستمی ورتونی^۱

۱- استادیار شیمی تجزیه گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، ایران
۲- کارشناس ارشد گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، مرکز قم، ایران

دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶، بازنگری: شهریور ۱۳۹۶، پذیرش: مهر ۱۳۹۶

چکیده: توانایی پیوند و برهم‌کنش کمپلکس رنیم (I) تری‌کربونیل شامل لیگاند دی‌ایمینی [N_2N' بیس (بنزآلدئید)-(۲-دی‌ایمینواتان)] و با نام اختصاری [Re]، به DNA استخراج‌شده از تیموس گوساله (CT-DNA) با روش‌های طیف‌نورسنج UV-Vis، طیف‌سنجی فلورسانس، طیف دورنگ‌نمایی دورانی (CD)، دناوره شدن گرمایی و ولتامتری چرخه‌ای (CV) بررسی شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های طیفی هر کدام از این روش‌ها، به‌طور مجزا اطلاعاتی در خصوص چگونگی پیوند یادشده می‌دهد. در مجموع، از جمع داده‌های طیف‌نورسنج UV-Vis، طیف دورنگ‌نمایی دورانی CD و دناوره شدن گرمایی، نوع و مقدار برهم‌کنش کمپلکس‌ها با DNA تعیین و تغییرهای ساختار DNA بررسی شد. (K_b) ثابت پیوند کمپلکس با DNA، با استفاده از داده‌های طیف‌نورسنج UV-Vis محاسبه شد. نتایج نشان داد که کمپلکس [Re]، نسبت به سایر کمپلکس‌های شیف‌باز، به‌طور نسبی برهم‌کنش خوبی دارند. در همه آزمایش‌ها، برهم‌کنش را از طریق جایگیری جزیی و الکتروستاتیک پیشنهاد می‌کنند. البته برهم‌کنش از طریق جایگیری غالب است، چون بیشتر آزمایش‌ها این نوع برهم‌کنش را تأیید کردند.

واژه‌های کلیدی: برهم‌کنش میان‌کنش، کمپلکس رنیم، لیگاند شیف‌باز، پیوند به DNA

مقدمه

مو، کم‌خونی، تهوع، استفراغ و جلوگیری از دفع طبیعی ادرار را به‌دنبال دارند. علم داروشناسی جدید، در ابعاد ژنی بر عملکرد داروهایی که به DNA پیوند می‌شود، استوار است. بررسی‌های برهم‌کنش دارو-DNA سطح وسیعی از پژوهش‌ها را شامل می‌شوند [۱]. تعدادی از داروهای ضدسرطان، فعالیت زیستی خود را با برهم‌کنش مستقیم با DNA سلولی نشان می‌دهند. یکی از نشانگاه‌های مهم مولکولی در طراحی ترکیبات ضد

شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی سه روش اصلی درمان سرطان هستند. متأسفانه روش جراحی نه تنها برای بیمار ناخوشایند بوده بلکه در جلوگیری از انتشار سرطان ناموفق است. از طرفی دیگر، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در درمان سرطان خون و سرطان‌هایی که از یک ناحیه به نواحی دیگر بدن گسترش می‌یابند، مؤثرترند. البته عوارض جانبی ناخوشایندی مانند ریزش

ژانگ و همکارانش [۷] گزارش کردند که کمپلکس مس حاوی لیگاندهای تائورین^۱ و سالیسیل آلدهید شیف‌باز با DNA برهم‌کنش مناسبی دارد. جینگ و همکارانش [۸] کمپلکسی از وانادیم شامل لیگاندهای ال-والین^۲ شیف‌باز و ۱،۱۰-فنانترویلین تهیه و برهم‌کنش را از نوع جایگیری با DNA تیموس گاوی گزارش کردند. جانا و همکارانش [۹] کمپلکسی از مس حاوی لیگاند پی‌پیرین-۲-ایلمتیل-پیریدین-آمین^۳ تهیه و برهم‌کنش آن را با DNA بررسی کردند. در این کمپلکس نیز برهم‌کنش جایگیری جزئی^۴ با DNA را گزارش کردند. گزارش‌ها نشان داد که کمپلکس‌های حاوی لیگاندهای شیف‌باز توانایی ایجاد پیوند با DNA را دارند. در کارهای قبلی ما، بررسی‌هایی در برهم‌کنش کمپلکس‌های قابل حل نیکل [۴]، مس [۱۰] و کبالت [۱۱] حاوی مخلوط لیگاندهای ۲و۶-دی کربوکسیلیک اسید^۵ و ۲-آمینو پیریمیدین^۶ با DNA صورت گرفته است. تمام نتایج نشان داد که این کمپلکس‌ها به‌عنوان مولکول‌های کوچک، برهم‌کنش مناسبی از نوع جایگیری با DNA دارند.

در این کار پژوهشی، با توجه به اهمیت برهم‌کنش مولکول‌های کوچک با DNA در جهت توسعه داروهای ضدتومور، برهم‌کنش کمپلکس رنیم (I) تری‌کربونیل شامل شیف‌باز (طرح‌واره ۱) با DNA تیموس گوساله (CT-DNA)، با استفاده از روش‌های طیف‌نورسنج و اسپکتروفلوریمتری، دورنگ‌نمایی دورانی، دنا توره‌شدن گرمایی، به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. تا به حال گزارشی از برهم‌کنش کمپلکس رنیم (I) تری‌کربونیل شامل شیف‌باز با DNA ارائه نشده است.

روش تجربی

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت تجاری Merck و DNA استخراج‌شده از تیموس گوساله (CT-DNA) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شده‌اند. طیف ارتعاشی ترکیب‌ها در ناحیه ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ با طیف‌سنج فروسرخ تبدیل

سرطان، DNA است. بیشتر داروها، به‌عنوان بازدارنده در تهیه اسیدهای نوکلئیک عمل کرده و در برهم‌کنش با DNA، DNA را از ساختار عادی خود خارج ساخته و در نتیجه فعالیت طبیعی آن را مختل می‌کنند. از طرفی رادیکال‌های آزاد می‌توانند به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA بافت‌های زیستی آسیب برسانند، که باعث تسریع سرطان شود. ضداکسیدان به علت خاصیت ربانندگی رادیکال، جلوی این آسیب‌ها را می‌گیرند. در درمان سرطان، ترکیب‌هایی که دو خاصیت ضداکسیدانی و پیوند به DNA را با هم داشته باشند، بسیار اهمیت دارد. بنابراین، مطالعه پیوند ترکیب‌های متفاوت با DNA دارای اهمیت زیادی است. به‌منظور، بررسی توانایی کمپلکس‌های فلزی در تشخیص و واکنش با DNA، انواع متفاوتی از کمپلکس‌ها تهیه شده‌اند که در میان آن‌ها کمپلکس‌های فلزی شیف‌باز به دلیل فعالیت‌های زیستی و ضدسرطانی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند [۲ و ۳]. شیف‌بازها لیگاندهای چند منظوره‌اند که فراهم‌کننده اتم‌های دهنده مناسب برای واکنش با یون‌های فلزی هستند. شیف‌بازها از واکنش بین آمین نوع اول با یک کتون یا آلدهید که حاوی ترکیب‌هایی با گروه عاملی (C=N-H) هستند، تشکیل می‌شوند. در این ساختار N، به‌عنوان اتم دهنده عمل کرده و اگر یک گروه عاملی مناسب مانند SH، OH و غیره در مجاور گروه ایمین باشد، این ترکیب‌ها را قادر می‌سازد تا به‌عنوان لیگاند سازنده کی‌لیت عمل کرده و با یون‌های فلزی واکنش دهند. بنابراین، به‌طور گسترده تهیه و چگونگی ساختار و توانایی واکنش آن‌ها با DNA بررسی شده است [۴ و ۵]. این کمپلکس‌ها با پیوند به مولکول DNA فعالیت خود را در بدن شروع می‌کنند. به‌همین منظور، محل‌های خاصی از DNA برای پیوند به این کمپلکس‌ها مورد هدف قرار گرفته تا با دادن یک ناپایداری مناسب به فلز، برهم‌کنش را آغاز کند. به‌طور معمول، این برهم‌کنش‌ها به سه حالت الکتروستاتیکی، پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش صفحه‌های آروماتیک با جفت رشته‌ها اتفاق می‌افتد که در حالت سوم هم‌پوشانی بهتر صورت گرفته و برهم‌کنش آن بیش‌تر و از حساسیت مناسبی برخوردار است [۶].

1. Taurine 2. L-Valine Schiff Base 3. Piperidin-2-ylmethyl-pyridin-2-ylmethylene-amine 4. Partial intercalation
5. Pyridine-2,6-dicarboxylic acid 6. 2-aminopyrimidine

تهیه محلول DNA و تعیین غلظت آن

تمام آزمایش‌ها در دمای اتاق °C ۲۵ و محیط بافر Tris-HCl (۵ میلی‌مولار) و (NaCl ۱۰ میلی‌مولار) که با NaOH، pH آن را به ۷٫۳ (pH محیط کارانداز) رسانده، انجام شد. محلول استوک کمپلکس [Re] درحلال دی‌کلرومتان تهیه و برای به حجم رساندن همه محلول‌های رقیق از بافر Tris-HCl و NaCl استفاده شد. برای تهیه محلول استوک از DNA، ابتدا ۰٫۰۰۵ گرم از CT-DNA در ۵ میلی‌لیتر محلول بافر تریس حل شد. سپس، برای تهیه محلول رقیق‌تر مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استوک، در بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری با بافر تریس به حجم رسانده شد. سپس، طیف محلول رقیق DNA با دستگاه طیف‌نورسنج گرفته و با جذب آن در ۲۶۰ نانومتر ($\epsilon_{DNA}=6600$)، غلظت DNA تعیین شد.

بررسی طیف‌سنجی کمپلکس [Re] با DNA

ابتدا ۲٫۵ میلی‌لیتر از محلول کمپلکس با غلظت ۳۴٫۸۱ میکرومولار به سل نمونه افزوده و طیف آن گرفته شد. در چندین مرحله، حجم‌های مشخص از محلول DNA با غلظت ۴۳۵ میکرومولار به هر دو سل نمونه و شاهد افزوده شد، به طوری که غلظت DNA به کمپلکس به صورت مرحله‌ای افزایش یابد. علت افزودن DNA به هر دو سل این است که DNA در ناحیه موردبررسی دارای جذب است. وقتی که DNA به هر دو سل نمونه و شاهد افزوده شد، اثر جذب DNA حذف و دیگر جذب مربوط به آن مشاهده نمی‌شود و تغییرهای ایجادشده در جذب کمپلکس مربوط به اثر واکنش کمپلکس و DNA است. هر بار، پس از افزایش محلول DNA، محلول داخل سل هم‌زده و طیف آن در ناحیه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر اسکن شد. برای تیتراژ معکوس یعنی تیتراژ کردن DNA با کمپلکس رنیم، ۲٫۵ میلی‌لیتر از DNA با غلظت ۶۹٫۸ میکرومولار را در سل نمونه ریخته و با کمپلکس به غلظت ۱۰۴ میکرومولار تیتراژ شد. پیش از هر سری خواندن جذب، برای صفر کردن جذب کمپلکس باید محلول تیتراژکننده کمپلکس به هر دو سل شاهد و نمونه افزوده می‌شد تا تغییرهای احتمالی بر

فوریه (FT-IR) شیمادزو مدل IRPrestige-21 و با استفاده از قرص پتاسیم‌برمید (KBr) گرفته شد. طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته ($^1\text{H-NMR}$) ترکیب‌ها با دستگاه NMR از نوع Avance DRX-500 MHz Bruker با شاهد داخلی ترامتیل‌سیلان (TMS)، در دمای محیط و در حلال DMSO- d_6 ثبت شدند. طیف‌های فلورسانس با دستگاه Cary مدل Eclipse، طیف‌های نورسنج (UV-Vis) با دستگاه Shimadzu مدل UV-2550، طیف‌های CD با دستگاه Circular Dichroism Spectrometer مدل ۲۱۵ ساخت شرکت Aviv، طیف‌های T_m با دستگاه طیف‌نورسنج با مدل Biocary-100 و نمودارهای ولتامتری چرخه‌ای (CV) با دستگاه الکتروآنالیز Autolab مدل Pgstat101 گرفته شده‌اند. درصد عناصر کربن، هیدروژن و نیتروژن کمپلکس با دستگاه تجزیه عنصری LECO مدل CHNS-932 اندازه‌گیری شد.

تهیه لیگاند دی‌ایمین N,N' -بیس (بنزآلدئید) -۱-۲-دی‌ایمینواتان

۱۲ میلی‌مول بنزآلدئید (۱٫۲ میلی‌لیتر) با ۶ میلی‌مول اتیلن‌دی‌آمین (۰٫۴ میلی‌لیتر)، در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۱ ساعت هم‌زده شدند. پس از سرد کردن محلول تا دمای محیط، عمل بلورینگی مجدد بر جامد زرد رنگ به دست آمده، در حلال اتانول انجام شد. بلورهای روی صافی جدا و با اتانول سرد شسته و خشک شدند.

تهیه کمپلکس رنیم (I) با لیگاند دی‌ایمین

محلولی از پنتاکربونیل رنیم (I) کلرید (۰٫۵ میلی‌مول، ۱۸۱ میلی‌گرم) با مقدار مولی برابر از لیگاند تهیه‌شده در قسمت پیش، در ۲۰ میلی‌لیتر حلال شامل ۱۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان بازروانی شد. پس از سرد کردن مخلوط واکنش تا دمای محیط و افزودن هگزان نرمال، محصول موردنظر به صورت بلورهای ریز زرد رنگ رسوب کرد. رسوب زرد صاف‌شده و با هگزان نرمال شستشو و خشک شد.

میکرومولار و غلظت DNA ۱۰۰ میکرومولار بود.

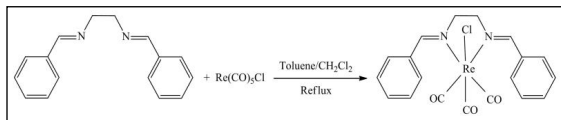
ولتامتری چرخه‌ای (CV)

آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای در دمای اتاق با سه الکتروود سلول الکتروشیمیایی معمولی انجام شد. کاربرد ولتامتری چرخه‌ای برای بررسی پیوند کمپلکس‌های فلزی با DNA و کامل‌کننده روش‌های بالا در پژوهش است [۱۲ و ۱۳].

کمپلکس [Re] با غلظت ۶۳/۳ میکرومولار در بافر آب حاوی غلظت ۵mM از Tris-HCl و ۵۰mM از NaCl با pH=۷٫۳ آماده شد. ولتامتری چرخه‌ای از کمپلکس [Re] در گستره ۱٫۳- تا ۱٫۵۲ با الکتروود Ag/AgCl به‌عنوان الکتروود مرجع، الکتروود پلاتین به‌عنوان الکتروود کمکی و الکتروود طلا به‌عنوان الکتروود کار به‌دست آمده است.

نتیجه‌ها و بحث

لیگاند شیف‌باز دودندانه برای تهیه کمپلکس رنیم، از طریق واکنش تراکمی بین اتیلن‌دی‌آمین و بنزالدهید در حلال اتانول تهیه شد. در شکل ۱ طرح‌واره واکنش تهیه کمپلکس رنیم به‌کار گرفته شده در این پژوهش، آورده شده است. همچنین، براساس مطالعه‌های انجام‌شده [۱۴ تا ۱۷] در ساختارهای بلوری کمپلکس‌های مشابه و نیز با توجه به طیف‌های FT-IR و H-NMR کمپلکس رنیم، با ساختار زیر مطابقت دارد.



شکل ۱ طرح‌واره روش تهیه کمپلکس [Re]

با توجه به فرمول تجربی کمپلکس $(C_{19}H_{16}ClN_2O_3Re)$ و جرم مولی آن ($M=541.85 \text{ g/mol}$)، مقدار محاسبه‌شده عناصر کربن، هیدروژن و نیتروژن موجود در کمپلکس به‌ترتیب ۴۲٫۱۱، ۲٫۹۵ و ۵٫۱۷ درصد است. درصدهای به‌دست آمده با مقادیر تجزیه عنصری که به‌ترتیب ۴۱٫۹۰، ۲٫۸۴ و ۵٫۰۱ درصد هستند، تطابق

طیف محلول DNA در اثر افزودن کمپلکس، حذف شود. به‌گونه‌ای که، تغییرهای مشاهده شده فقط ناشی از برهم‌کنش کمپلکس با DNA باشد. همچنین، پس از هر بار افزودن کمپلکس به محلول داخل سل DNA، عمل آمیخته شدن صورت گرفته و پس از آن طیف محلول گرفته شد.

بررسی اسپکتروفلوئوریمتری کمپلکس [Re] با DNA

طیف فلئورسانس کمپلکس [Re] با دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر بر ۱۰ و ۵ نانومتر و $PMT=Manua$ در طول موج‌های $\lambda_{ex}=370 \text{ nm}$ و $\lambda_{em}=426 \text{ nm}$ به همراه تنظیم شکاف‌های برانگیختگی و نشر گرفته شد. در این آزمایش، ۲ میلی‌لیتر از محلول کمپلکس با غلظت ۳۵/۴۴ میکرومولار در سل نمونه ریخته و به‌وسیله DNA با غلظت ۴۷۲٫۵ میکرومولار تیترا شد. به‌طوری که هر بار پس از افزودن DNA به محلول کمپلکس، محلول تحت عمل آمیخته‌شدن قرار گرفته و تغییرهای طیف نوری آن ثبت شد.

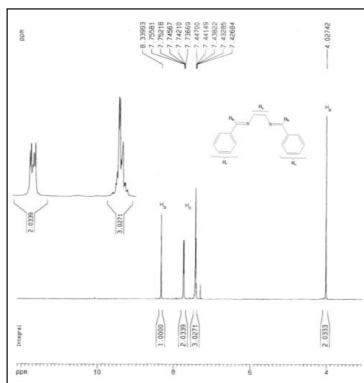
بررسی‌های طیف‌سنجی روبش دمایی DNA

به‌منظور تعیین اثر کمپلکس بر دمای ذوب DNA، از روش طیف‌سنجی روبش دمایی استفاده شد. این سری آزمایش‌ها با دستگاه طیف‌نورسنج با توان تغییر دما به مقدار یک درجه سانتی‌گراد در دقیقه انجام و جذب DNA در هر دما در طول موج ۲۶۰ نانومتر و گستره دمایی ۵۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بیان شد. نمونه‌های به‌کار رفته در این آزمایش عبارت‌اند از: یک نمونه حاوی تنها DNA که به‌عنوان نمونه شاهد و یک نمونه حاوی کمپلکس [Re]، $[Re]/[DNA]=0.53$ تهیه شد. غلظت کمپلکس [Re] ۴۰٫۴ و غلظت DNA، ۷۵ میکرومولار بود.

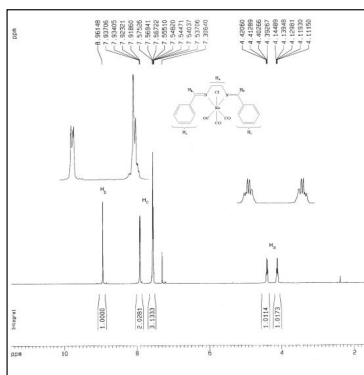
دورنگ‌نمایی دورانی

در این آزمایش یک نمونه حاوی تنها DNA که به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد و مخلوط کمپلکس [Re] و [DNA] با نسبت $[Re]/[DNA]=0.5$ تهیه شد. غلظت کمپلکس [Re] ۵۰

طیف $^1\text{H-NMR}$ لیگاند در شکل ۴ نشان می‌دهد که هیدروژن‌های آلیفاتیک (H_a) در ناحیه ۴٫۰۳ ppm ظاهر شده و انتگرال این پروتون‌ها با تعداد ۴ پروتون بیانگر این است که به حلقه کی‌لیت اتیلندی‌آمین تعلق دارند [۱۵ و ۱۶]. به دلیل متقارن بودن لیگاند و معادل بودن پروتون‌ها، رزونانس آن‌ها به صورت یکتایی است. در ناحیه ۸٫۳۴ ppm یک پیک یکتایی ظاهر شده که مربوط به دو پروتون ایمینی (H_b) موجود در این لیگاند است. در ناحیه ۷٫۴۳ تا ۷٫۷۶ ppm پروتون‌های آروماتیک (H_c) ظاهر شده‌اند [۱۷]. نکته قابل توجه در شکل ۵ طیف $^1\text{H-NMR}$ کمپلکس آن است که پیک مربوط به پروتون‌های آلیفاتیک (H_a) که در ناحیه ۴٫۱۱-۴٫۴۲ ppm ظاهر می‌شوند، به علت معادل نبودن پروتون‌های گروه‌های متیلن با یکدیگر به صورت دو گروه چندتایی دیده می‌شوند [۱۵]. این مطلب بیانگر آن است که کمپلکس تهیه شده رنیم (I)، دارای ساختار هشت‌وجهی وایپچیده است.

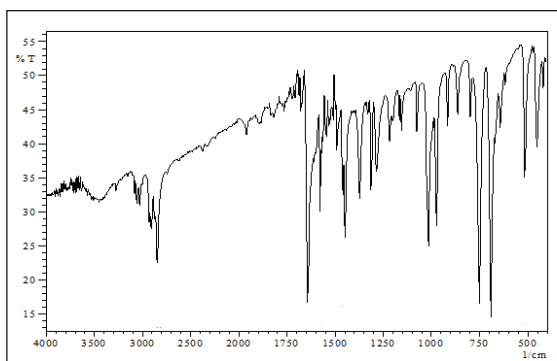


شکل ۴ طیف رزونانس مغناطیسی هسته لیگاند

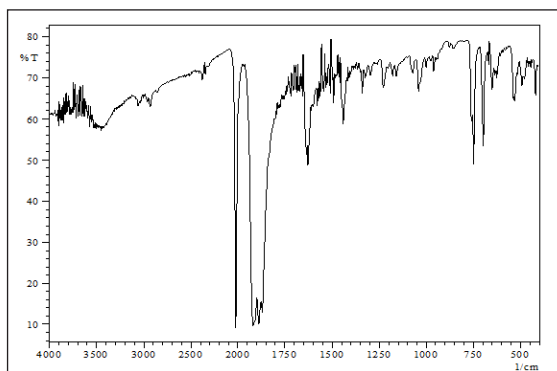


شکل ۵ طیف رزونانس مغناطیسی هسته کمپلکس [Re]

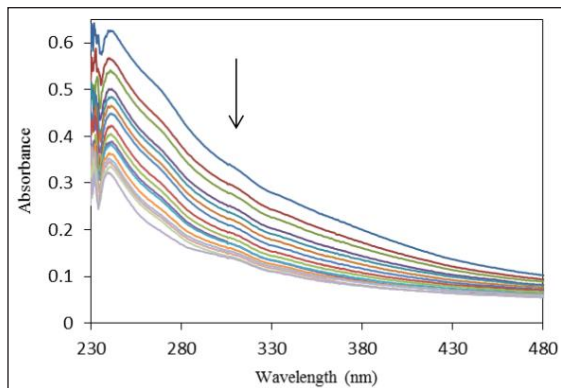
خوبی دارند. طیف‌های ارتعاشی لیگاند و کمپلکس در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است. ارتعاش کششی C=N یک جذب اصلی به ترتیب در گستره 1641 cm^{-1} و 1626 cm^{-1} نشان می‌دهد [۱۸]. به‌طور کلی، با کوئوردینه شدن گروه ایمین به اتم فلز، چگالی بار منفی روی فلز افزایش یافته و اتم مرکزی از طریق پیوند برگشتی برای کاهش بار منفی خود، چگالی بار الکترونی اضافی خود را به اوربیتال ضد پیوندی π^* گروه C=N منتقل کرده و در نتیجه مرتبه پیوند کاهش و نوار ارتعاشی آن پایین می‌آید [۱۴]. افزون بر نکته یادشده، پدید آمدن سه نوار جذبی مربوط به کربونیل در کمپلکس رنیم (I) تری کربونیل با ساختار هشت‌وجهی و تقارن C_3 ، در گستره $1870\text{--}2020\text{ cm}^{-1}$ ، شاهدی بر تشکیل کمپلکس است [۱۹ و ۲۰].



شکل ۲ طیف فروسرخ تبدیل فوریه لیگاند دی‌ایمین

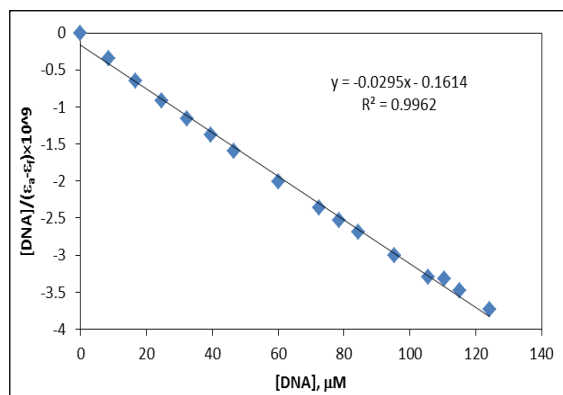


شکل ۳ طیف فروسرخ تبدیل فوریه کمپلکس [Re]



شکل ۷ طیف جذبی (UV-Vis) مربوط به تیتراژ کردن کمپلکس [Re] با غلظت ۳۴,۸۱ میکرومولار در محلول بافر تریس با افزایش CT-DNA با نسبت [DNA]/[Re] برابر با صفر تا ۵

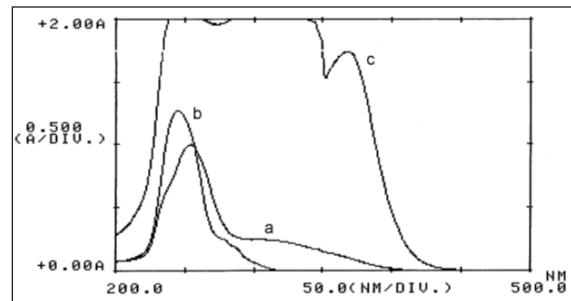
که در آن [DNA] ϵ_a ، ϵ_f و ϵ_b به ترتیب غلظت کلی CT-DNA، ضریب جذب کمپلکس در هر افزایش تیتراژ به دست آمده از Aobs/[Re]، ضریب جذب کمپلکس آزاد و ضریب جذب کمپلکس پیوند شده به DNA هستند. همچنین، از رسم $([DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f))$ بر حسب [DNA]، نسبت شیب به عرض از مبدأ، K_b به دست می‌آید (شکل ۸).



شکل ۸ نمودار $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ در برابر [DNA] مربوط به کمپلکس [Re]

به طور کلی، دو ویژگی طیفی هایپروکرومیسم و هایپوکرومیسم مربوط به ساختار مارپیچ دو رشته‌ای DNA هستند. هایپروکرومیسم

در شکل ۶ طیف الکترونی لیگاند دی‌ایمین و کمپلکس رنیم مربوط آورده شده که دارای نوارهای جذبی در گستره ۲۳۰ تا ۳۰۰ nm هستند. این نوارها مربوط به انتقال‌های جفت الکترون غیر پیوندی n به اوربیتال مولکول ضد پیوندی $\pi^*(n \rightarrow \pi^*)$ در پیوند ایمنی (C=N) و انتقال از اوربیتال مولکولی پیوندی π به اوربیتال مولکولی ضد پیوندی $\pi^*(\pi \rightarrow \pi^*)$ در پیوند ایمنی یا حلقه آروماتیک هستند. در کمپلکس تهیه شده رنیم (I) با آرایش الکترونی d^6 ، به دلیل وجود اوربیتال‌های خالی ضد پیوندی π^* مناسب بر لیگاند و اوربیتال‌های d دارای الکترون، امکان انتقال بار از فلز به لیگاند (MLCT) وجود دارد.



شکل ۹ طیف‌های UV-Vis کمپلکس [Re] و لیگاند دی‌ایمین (c = 1×10^{-3} M و a = 4×10^{-5} M) (b = 4×10^{-5} M)

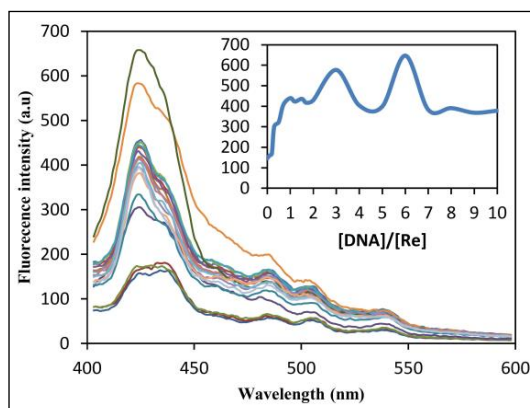
طیف جذبی UV-Vis مربوط به تیتراژ کردن کمپلکس [Re] در محلول بافر تریس با افزایش CT-DNA، در شکل ۷ آورده شده است. با بررسی‌های طیف نورسنج تیتراژ کردن کمپلکس [Re] با DNA، می‌توان ثابت پیوند و K_b را محاسبه کرد. برای کنترل مقدار قدرت یا شدت پیوند ترکیب‌ها با DNA، K_b عامل مهمی است. K_b از طریق تغییرهای به وجود آمده در جذب λ_{max} مربوط به کمپلکس [Re] و افزایش غلظت‌های DNA با استفاده از معادله ۱ قابل بیان است [۶].

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA](\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b (\epsilon_a - \epsilon_f)$$

معادله (۱)

1. Intercalation

شکل ۱۰ تغییرات نشر فلورسانس کمپلکس [Re] با افزایش DNA را در نسبت‌های مولی متفاوت نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تغییرها نامنظم و نیز با افزایش DNA تا نسبت مولی [DNA]/[Re] برابر با ۱، شدت فلورسانس کمپلکس افزایش یافته است. همچنین، تغییرها بیانگر آن است که برهم‌کنش مناسب بین کمپلکس رنیم و DNA باعث افزایش سختی ساختمان کمپلکس شده است [۶]. افزون بر آن، سختی کمپلکس‌ها باعث افزایش شدت فلورسانس شده است. پس از افزایش DNA با نسبت بیشتر از یک، تغییرات نامنظم و نوسانی در شدت فلورسانس مشاهده شد که دلیل روشنی برای این موضوع به‌دست نیامد.



شکل ۱۰ طیف نشری فلورسانس مربوط به تیتراژ کردن کمپلکس [Re] ($35.44 \mu\text{M}$) در محلول بافر تریس با افزایش CT-DNA با نسبت [DNA]/[Re] برابر با صفر تا ۱۰

برای بررسی بیشتر برهم‌کنش کمپلکس رنیم با DNA، از مطالعات روبش دمایی Tss مربوط به DNA در حضور و عدم حضور کمپلکس استفاده شد (شکل ۱۱). دمای ذوب شدن DNA (T_m) به شدت وابسته به پایداری ماریچ دوگانه است. در این حالت ممکن است که تحت تأثیر برهم‌کنش با ترکیب‌های شیمیایی قرار گرفته و T_m در اثر این برهم‌کنش تغییر کند. کومار و همکارانش نشان دادند که برهم‌کنش از نوع میان‌کنش در DNA، موجب افزایش دمای T_m و پایداری ماریچ می‌شود. به گونه‌ای که، اگر تغییر ΔT_m در گستره ۵ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد

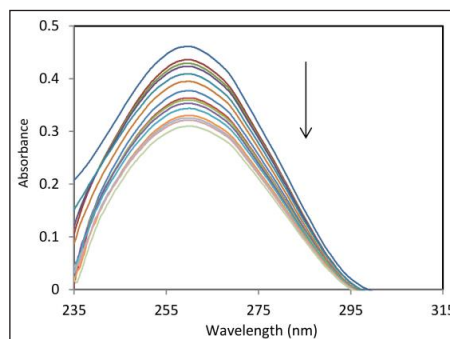
(افزایش جذب)، نشان‌دهنده شکست در ساختار دو رشته DNA و هیپوکرومیسم (کاهش جذب)، نشان‌دهنده پیوند به DNA تحت تأثیر پیوندهای الکتروستاتیک و یا میان‌کنش^۱ است که در اثر برهم‌کنش جایگیری، ساختار ماریچ دو رشته‌ای DNA نیز پایدار می‌شود [۲۱]. مشخصات طیفی UV-Vis، مقدار جابه‌جایی برحسب نانومتر و درصد هیپوکرومیسم تیتراژ کردن کمپلکس [Re] با DNA در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ نتایج به‌دست آمده از مشخصات طیفی UV-Vis، مقدار جابه‌جایی برحسب نانومتر و درصد هیپوکرومیسم کمپلکس [Re] با DNA

کمپلکس	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda$ جابه‌جایی آبی (nm)	هیپوکرومیسم %	K_b
[Re]	۲۴۰.۸	۱.۴	۳۲	5.47×10^6

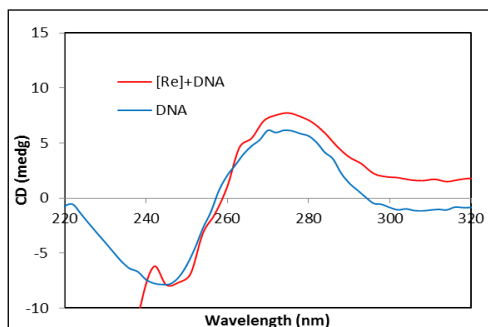
مقدار ثابت پیوند (K_b) به‌دست آمده برای کمپلکس [Re] از نمودار شکل ۸ برابر 5.47×10^6 به‌دست آمد که در مقایسه با برهم‌کنش از نوع میان‌کنش کلاسیک اتیدیم برمید که ثابت پیوند آن در گستره ۱۰۶ تا ۱۰۷ است، بیانگر برهم‌کنش کمپلکس [Re] با DNA از نوع میان‌کنش است [۲۱].

شکل ۹ طیف جذبی UV-Vis مربوط به تیتراژ کردن DNA در محلول بافر تریس با افزایش غلظت کمپلکس را نشان می‌دهد. کاهش جذب در بیشینه طول موج جذبی DNA (۲۶۰ نانومتر) بدون هیچ‌گونه جابه‌جایی قرمز، نشان‌دهنده برهم‌کنش کمپلکس با DNA است که منجر به تشکیل کمپلکس جدیدی از ماریچ دو رشته‌ای DNA می‌شود.



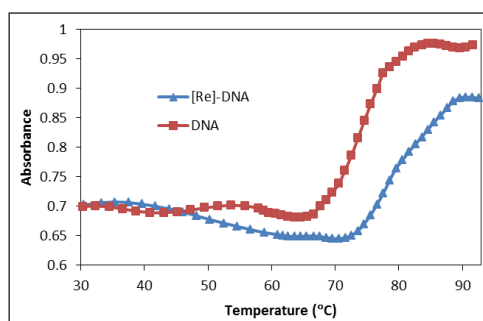
شکل ۹ طیف جذبی (UV-Vis) مربوط به تیتراژ کردن DNA ($69/8 \mu\text{M}$) در محلول بافر تریس با افزایش غلظت کمپلکس [Re] با نسبت [DNA]/[Re] برابر با صفر تا ۰/۶

۱۲، طیف CD مربوط به DNA، در حضور و غیاب کمپلکس را نشان می‌دهد. از آنجایی که برهم‌کنش کمپلکس [Re] با DNA باعث افزایش نوار ۲۷۵ نانومتر شده و نوار ۲۴۵ نانومتر نیز تغییر کرده است، می‌توان نتیجه گرفت که این برهم‌کنش از نوع میان‌کنش است.



شکل ۱۲ طیف‌های CD مربوط به DNA در حضور و در غیاب کمپلکس [Re] و با نسبت [DNA]/[Re] برابر با ۵

باشد، تأییدی بر برهم‌کنش از نوع جایگیری است و اگر کمتر از ۵ درجه سانتی‌گراد باشد، تأییدی بر برهم‌کنش از نوع شیار فرعی و اصلی است [۲۲]. همان‌طور که در شکل (۱۰) مشاهده می‌شود، تغییرهای دمای ذوب DNA در حضور کمپلکس [Re]، ۶٫۵ درجه سانتی‌گراد است که بیانگر میان‌کنش بین کمپلکس و DNA است.

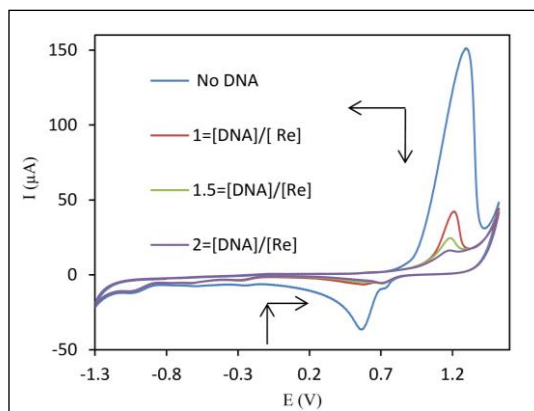


شکل ۱۱ نمایش تغییرهای جذب DNA برحسب دما در حضور و غیاب کمپلکس [Re]

شکل ۱۳، ولتامتری چرخه‌ای (CV) کمپلکس رنیم را در عدم حضور CT-DNA و در سرعت‌های متفاوت با اسکن متفاوت را نشان می‌دهد. با افزایش سرعت اسکن یک پیک اکسایش و کاهش تک الکترونی در ناحیه آندی و کاتدی مشاهده شده است. همچنین، با افزایش شدت جریان پیک کاتد و آند، پتانسیل پیک آندی E_{pa} به مقدار مثبت‌تر و پتانسیل پیک کاتدی E_{pc} به مقدار منفی‌تر جابه‌جا می‌شود که این رفتار بیانگر یک سامانه شبه برگشت‌پذیر است [۲۴]. ولتامتری چرخه‌ای این کمپلکس در حضور CT-DNA با نسبت [DNA]/[Re] برابر با ۱ و در سرعت‌های متفاوت اسکن در شکل ۱۴ نشان داده شده است. مشاهده شد که در حضور CT-DNA، رفتار شبه برگشت‌پذیر تبادل الکترون کمپلکس حفظ شده است.

شکل ۱۵ ولتامتری چرخه‌ای (CV) این کمپلکس را در حضور CT-DNA با نسبت [DNA]/[Re] برابر با صفر تا ۲ و با سرعت اسکن 50 mVs^{-1} را نشان می‌دهد. اگر پیک نمونه با افزایش DNA کاهش یافته و تغییر پتانسیل پیک آندی و کاتدی (ΔE_p)

طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) در بررسی‌های ساختاری اسیدهای نوکلئیک مورد استفاده قرار گرفت. این روش در مورد اینکه زنجیره DNA چگونه تحت تأثیر کمپلکس پیوندی قرار گرفته است، اطلاعات مفیدی به ما می‌دهد. در واقع طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی، بر اساس اختلاف جذب نور پلاریزه چپ‌گرد و راست‌گرد است. دورنگ نمایی دورانی برای بررسی ساختاری DNA پس از برهم‌کنش با کمپلکس، در مقایسه با DNA آزاد به کار برده شد. طیف CD به دست آمده از DNA وابسته به ساختار دوم نشان‌دهنده دو نوار است. یک نوار CD در ناحیه مثبت در طول موج ۲۷۵ نانومتر به دلیل بارهای انباشته و نوار منفی در طول موج ۲۴۵ نانومتر به علت ساختار دوم DNA (ساختار ماریچ راست‌گرد) است. این نوارها به چگونگی برهم‌کنش DNA با سایر مولکول‌ها، بسیار حساس هستند و تحت تأثیر نوع برهم‌کنش تغییر می‌کنند. برهم‌کنش از نوع میان‌کنش کمپلکس با DNA، باعث افزایش شدت در نوار ۲۷۵ نانومتر و کاهش شدت در نوار ۲۴۵ نانومتر می‌شود [۲۳]. شکل



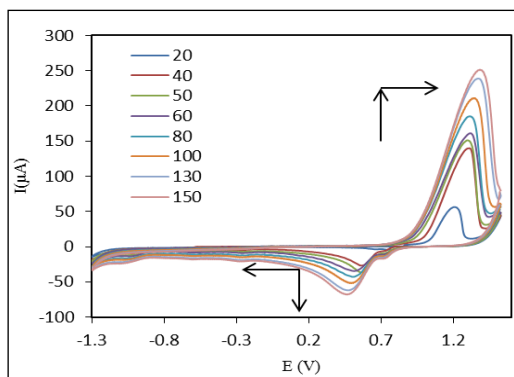
شکل ۱۵ ولتامتری چرخه‌ای کمپلکس [Re] در حضور مقادیر متفاوت DNA با سرعت اسکن 50 mVs^{-1}

توانایی پیوند و نوع برهم کنش کمپلکس کار حاضر با DNA، از مقایسه نتایج به دست آمده با نتایجی که در سال‌های اخیر برای کمپلکس‌های مشابه دارای لیگاند‌های شیف‌باز گزارش شده است، قابل بررسی است. در جدول ۲، نتایج این مقایسه آورده شده است. همان‌طور که مشاهده شد، ثابت پیوند کمپلکس [Re] نسبت به سایر کمپلکس‌های حاوی لیگاند‌های شیف‌باز بالاتر است.

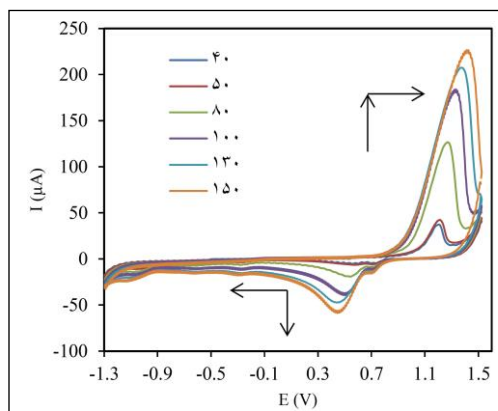
نتیجه‌گیری

در این پژوهش، برهم کنش یک کمپلکس رنیم (I) تری کربونیل شامل لیگاند دی‌ایمینی با DNA مورد بررسی قرار گرفت. این نوع برهم کنش، با استفاده از روش‌های طیف‌نورسنجی، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، اسپکتروفلوریمتری، دنا توره‌شدن گرمایی و ولتامتری چرخه‌ای به‌طور کامل و دقیق بررسی شد. در مطالعه طیف‌نورسنجی، برهم کنش کمپلکس با DNA جابه‌جایی قرمز را نشان داد. ثابت پیوند کمپلکس [Re] به CT-DNA، $5.47 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ به دست آمد که نشان داد به‌طور نسبی ترکیب حاضر نسبت به سایر کمپلکس‌های شیف‌باز، برهم کنش خوبی دارد. از ولتامتری چرخه‌ای برای بررسی مشخصات الکتروشیمیایی، برهم کنش بین DNA و کمپلکس استفاده شد. مطالعه رویش دمایی DNA نیز نشان‌دهنده افزایش دمای ذوب DNA از 73.5 به 81 درجه سانتی‌گراد در حضور کمپلکس [Re] است. طیف

مثبت شود، این تغییر نشان‌دهنده میان‌کنش بوده که شامل برهم کنش آب‌گریز در داخل مولکول DNA است. همچنین، اگر با افزایش DNA پیک نمونه افزایش و ΔE_p منفی شود، این تغییر نشان‌دهنده برهم کنش الکترواستاتیک با DNA در مکان‌های آنیونی است [۲۵]. افزون بر آن، گزارش شده است که یک تغییر مثبت پیک کاتدی E_{pc} و یک تغییر منفی پیک آندی E_{pa} بیانگر این است که مولکول می‌تواند با DNA به دوطریق الکترواستاتیک و میان‌کنش پیوند برقرار کند [۲۶]. همان‌طور که در شکل ۱۱ مشاهده شد، با افزایش DNA شدت جریان آند و کاتد کاهش یافته و پتانسیل پیک کاتد به سمت مثبت و پتانسیل پیک آند به سمت منفی جابه‌جا شدند. پس، کمپلکس با DNA می‌تواند به دو حالت الکترواستاتیک و برهم کنش پیوند برقرار کند.



شکل ۱۳ ولتامتری چرخه‌ای کمپلکس [Re] در سرعت‌های متفاوت اسکن (mVs^{-1})



شکل ۱۴ ولتامتری چرخه‌ای کمپلکس [Re] در حضور DNA و در سرعت‌های متفاوت اسکن (mVs^{-1})

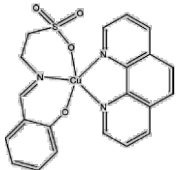
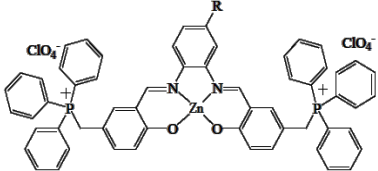
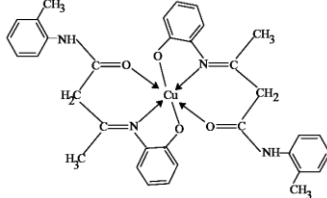
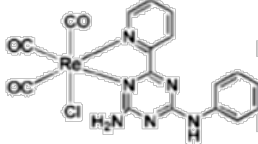
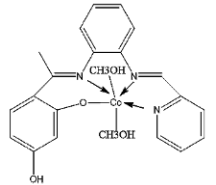
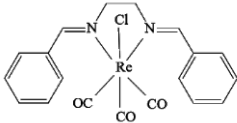
و جایگیری جزئی است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه پیام نور مرکز قم صمیمانه تشکر می‌کنند.

CD مربوط به DNA، افزایش شدت در نوار مثبت و کاهش شدت در نوار منفی را نشان داد که نشانه تغییر فرم B به فرم Z، مربوط به DNA است. نتایج تمام بررسی‌ها نشان داد که پیوند این کمپلکس با DNA از طریق برهم‌کنش الکتروستاتیک

جدول ۲ مقایسه نتایج مطالعه برهم‌کنش کمپلکس‌های متفاوت. (مقالات دیگران با نتیجه کار حاضر) با CT-DNA

ساختار کمپلکس	ثابت پیوند (M^{-1})	نوع برهم‌کنش	مرجع
	$1,66 \times 10^4$	جایگیری	[۲۷]
	$2,54 \times 10^2$	—	[۲۸]
	$4,94 \times 10^4$	جایگیری	[۲۹]
	$3,6 \times 10^4$	شیاری	[۳۰]
	$3,8 \times 10^4$	شیاری	[۳۱]
	$5,47 \times 10^6$	الکتروستاتیک و جایگیری جزئی	کار حاضر

- [1] Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.A.; J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 158, 274-279, 2016.
- [2] Jana, K.; Maity, T.; Mahapatra, T.S.; Mohapatra, P.K.D.; Debnath, S.C.; Das, S.; Hossain, M.; Samanta, B.C.; Transition Met. Chem. 42, 69-78, 2017.
- [3] Shokohi-Pour, Z.; Chiniforoshan, H.; Sabzalian, M.R.; Esmaili, S.A.; Momtazi-borjani, V.; J. Biomol. Struct. Dyn. 36, 1-18, 2017.
- [4] Shahabadi, N.; Kashanian, S.; Darabi, F.; Eur. J. Med. Chem. 45, 4239-4245, 2010.
- [5] Afkhami, A.; Khajavi, F.; Khanmohammadi, H.; Anal. Chim. Acta 634, 180-185, 2009.
- [6] Bordbar, M.; Tabatabaee, M.; Yeganeh-Faal, A.; Mehri-Lighvan, Z.; Fazaeli, R.; Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem. 45, 1882-1888, 2015.
- [7] Zhang, X.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Yang, Z.; Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc. 77, 1-5, 2010.
- [8] Jing, B.; Dong, J.; Li, J.; Xu, T.; Li, L.; J. Coord. Chem. 66, 520-529, 2013.
- [9] Jana, K.; Maity, T.; Mahapatra, T.S.; Das Mohapatra, P.K.; Debnath, S.C.; Das, S.; Hossain, M.; Samanta, B.C.; Transition Met. Chem., 42, 69-78, 2017.
- [10] Bordbar, M.; Khodaie, F.; Tabatabaee, M.; Yeganeh-Faal, A.; Lighvan, Z.M.; Mohammad-Ganji, S; Bulg. Chem. Commun., 48, 422-429, 2016.
- [11] Bordbar, M.; Tabatabaee, M.; Alizadeh-Nouqi, M.; Mehri-Lighvan, Z.; Khavasi, H.R.; YeganehFaal, A.; Fallahian, F.; Dolati, M.; J. Iran. Chem. Soc. 13, 1125-1132, 2016.
- [12] Li, Y. F.; Huang, C. Z.; Huang, X. H.; Li, M.; Anal. Chim. Acta, 429, 311-319, 2001.
- [13] Psomas, G.J.; Inorg. Biochem. 102, 1798-1811, 2008.
- [14] Mirkhani, V.; Kia, R.; Vartooni, A.R.; Milik, D.; Transition Met. Chem. 34, 225-230, 2009.
- [15] Mirkhani, V.; Kia, R.; Vartooni, A.R.; Fun, H.K.; Polyhedron, 29, 1600-1606, 2010.
- [16] Mirkhani, V.; Kia, R.; Milik, D.; Vartooni, A.R.; Matkovic-Calogovic, D.; Transition Met. Chem., 35, 81-87, 2010.
- [17] Rostami-Vartooni, A.; Mirkhani, V.; Rudbari, H.A.; Moghadam, A.; J. Polyhedron 76, 22-28, 2014.
- [18] Kia, R.; Mirkhani, V.; Kalman, A.; Deak, A.; Polyhedron 26, 1711-1716, 2007.
- [19] Kia, R.; Safari, F.; Inorg. Chim. Acta 453, 357-368, 2016.
- [20] Kia, R.; Mirkhani, V.; Kalman, A.; Deak, A.; Polyhedron 26, 2906-2910, 2007.
- [21] Xi, P.; Xu, Z.; Chen, F.; Zeng, Z.; Zhang, X.; J. Inorg. Biochem. 103, 209-218, 2009.
- [22] Xi, P.; Xu, Z.; Liu, X.; Chen, F.; Huang, L.; Zeng, Z.; Chem. Pharm. Bull. 56, 541-546, 2008.
- [23] Wang, H.; Shen, R.; Tang, N.; J. Med. Chem. 44, 4509-4515, 2009.
- [24] Ni, Y.; Lin, D.; Kokot, S.; Anal. Biochem. 352, 231-242, 2006.
- [25] Mohamed, M.I.; Gaber, A.M.; Samir, A.; Abdel-Motaleb, M.R.; J. Electrochem. Sci. 7, 7526-7546, 2012.
- [26] Psomas, G.; J. Inorg. Biochem. 102, 1798-1811, 2008.
- [27] Li, L.; Guo, Q.; Dong, J.; Xu, T.; Li, J.; J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 125, 56-62, 2013.

- [28] Asadi, Z.; Haddadi, E.; Sedaghat, M.; J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 337, 140-150, 2017.
- [29] Raman, N.; Baskaran, T.; Selvan, A.; Jeyamurugan, R.; J. Iran. Chem. Res. 1, 129-139, 2008.
- [30] Ma, D.L.; Che, C.M.; Siu, F.M.; Yang, M.; and Wong, K.Y.; Inorg. Chem. 46, 740-749, 2007.
- [31] Shokohi-Pour, Z.; Chiniforoshan, H.; Sabzalian, M.R.; Esmaili, S.A.; Momtazi-borojeni, A.A.; J. Biomol. Struct. Dyn. 1-18, 2017.

Study of Calf thymus DNA interaction with Schiff base Re (I) tricarbonyl-diimine complex using different spectroscopic techniques

Maryam Bordbar^{1,*}, Fariba Tavoosi², Ali Yeganeh-Faal², Akbar Rostami Vartooni¹

1. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

2. M.Sc. of Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Payame Noor University, Qom, Iran

Received: April 2017, Revised: August 2017, Accepted: September 2017

Abstract: The interaction of Re (I) tricarbonyl-diimine complex ([Re]) with calf thymus DNA (CT-DNA) was investigated by using UV-Vis, fluorescence spectrophotometry, circular dichroism (CD) spectroscopy, thermal denaturation, and cyclic voltammetry (CV) studies. The binding constant value K_b of complex [Re] was found to be $5.47 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ using UV-Vis spectrophotometry data. The results show that the [Re] complex has relatively good interaction in comparison to other Schiff base complexes, indicating that the [Re] complex binds to DNA by electrostatic and partial intercalation modes. In addition, the intercalation mode is dominant via electrostatic interaction, as the most experiments confirm it.

Keywords: Intercalation Interaction, Rhenium complex, Schiff base ligand, DNA binding