

بررسی خواص ضدسرطانی ترکیب باز شیف بر پایه ۴و۵و۶-۷

تتراهیدروبنزو[d]تiazول

سودابه شکراللهی، احمد امیری*

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده شیمی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۱۱ - تاریخ تصحیح: - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۱۷

چکیده

در این پژوهش ترکیب باز شیف جدیدی با استفاده از واکنش تراکمی ۲-هیدروکسی-۱-نفتالدهید با ۴و۵و۶-۷-تتراهیدروبنزو[d]تiazول-۲-دی-آمین سنتز گردید. محصول بدست آمده با طیف سنجی‌های زیرقرمز و ^1H-NMR شناسایی گردید. برهمکنش این ترکیب با DNA استخراج شده از تیموس گوساله (ct-DNA) به کمک طیف سنجی فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی (CD) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین توانایی پیوند و نوع برهمکنش ترکیب باز شیف مربوطه با ct-DNA به کمک داده‌های غیرطبیعی شدن DNA و پارامترهای پیوندی و ترمودینامیکی برهمکنش ترکیبات با DNA تعیین شد. در نهایت خواص ضد سرطانی این ترکیب بروی دو رده‌ی سلول سرطانی HepG2 و MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اتصال ترکیب به DNA به صورت شیاری بوده و مقادیر IC_{50} این ترکیب برای دو رده‌ی سلولی HepG2 و MCF-7 به ترتیب $21 \pm 2 \mu M$ و $70 \pm 7 \mu M$ میکرومولار می‌باشد.

کلمات کلیدی: باز شیف، ct-DNA، غیر طبیعی شدن، خواص ضدسرطانی، دورنگ‌نمایی دورانی.

۱- مقدمه

بازهای شیف حاوی گروه ایمین یا آزومتین دسته وسیعی از ترکیبات آلی هستند که به دلیل ویژگی‌هایی متعدد از قبیل سنتز آسان از مواد در دسترس [۱]، تنوع ساختاری و قابلیت طراحی [۲] بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین این ترکیبات محدوده وسیعی از خواص بیولوژیکی از قبیل ضد سرطان، ضد تومور [۳-۵]، ضد باکتری [۶-۷]، ضد قارچ [۸]، آنتی اکسیدانت [۹] و ... را دارا می‌باشند.

افزایش مرگ و میر ناشی از سرطان در دهه‌های اخیر، توجه دانشمندان را به بررسی ترکیبات با خواص ضد سرطانی با تاثیر گذاری بیشتر و عوارض جانبی کمتر جلب کرده است [۱۰].

سرطان با روش‌های مختلفی درمان می‌شود که شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی سه روش اصلی درمان آن هستند. شیمی‌درمانی ایجاد تغییر در DNA سلول‌های سرطانی است که با تداخل در توانایی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی بیماری را کنترل می‌کند. در این راستا مولکول‌های کوچک با اتصال به DNA باعث اختلال در فرآیندهای مهم سلولی، مهار رشد و تقسیم در سلول سرطانی و در نتیجه آپوپتوز می‌شوند. از این رو مطالعه برهم‌کنش مولکول‌ها با DNA برای درک بهتر سازوکار عمل آن‌ها و طراحی ترکیبات دارویی جدیدتر و مؤثرتر حائز اهمیت می‌باشد. 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 [۱۱].

DNA هدف اصلی داروهای ضدسرطان است. مولکول DNA از دو رشته پلیمری زیستی که به صورت حلقه دور هم پیچ خورده و به شکل یک مارپیچ دوگانه درآمده ساخته شده است. دو رشته DNA به عنوان پلی نوکلئوتید شناخته شده، که از واحدهای ساده‌تری به نام نوکلئوتید ساخته شده‌اند. هر نوکلئوتید از یک باز آلی، گوانین (G)، سیتوزین (C)، آدنین (A)، تیمین (T) و یک قند مونوساکارید به نام دئوکسی ریبوز و همچنین یک گروه فسفات تشکیل شده است. نوکلئوتیدها به وسیله پیوند کوالانسی به صورت زنجیره‌ای به هم متصل می‌شوند، نوکلئوتیدها از محل قند یک نوکلئوتید با فسفات نوکلئوتید دیگر پیوند ایجاد کرده و ساختاری شبیه ستون فقرات را ایجاد می‌کنند [۱۲].

تعدادی از داروهای ضدسرطان، فعالیت زیستی خود را با برهم‌کنش مستقیم با DNA سلولی نشان می‌دهند. یکی از نشانگاه‌های مهم مولکولی در طراحی ترکیبات ضدسرطان، DNA است. بیشتر داروها، به عنوان بازدارنده در تهیه اسیدهای نوکلئیک عمل کرده و در برهم‌کنش با DNA، آن‌را از ساختار عادی خود خارج ساخته و در نتیجه فعالیت طبیعی آن را مختل می‌کنند. به منظور بررسی توانایی ترکیبات در تشخیص و واکنش با DNA، دسته وسیعی از ترکیبات تهیه شده‌اند که در میان آن‌ها بازهای شیف به دلیل فعالیت‌های زیستی و ضدسرطانی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند [۱۳-۱۴].

در این پژوهش، با توجه به اهمیت برهم‌کنش ترکیبات دارویی با DNA در جهت توسعه داروهای ضد تومور، ابتدا ترکیب شیف‌باز سنتز و شناسایی و در ادامه برهم‌کنش این ترکیب با DNA تیموس گوساله بررسی شد و نحوه اتصال این ترکیبات به ct-DNA نیز به کمک طیف‌سنجی فلورئوسانس و دورنگ‌نمایی حلقوی مورد بررسی قرار گرفت و اتصال به صورت شیاری برای این لیگاند تأیید شد. در نهایت به منظور بررسی سمیت خواص ضدسرطانی این ترکیب بروی دو رده‌ی سلول سرطانی HepG2 و MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

مواد مورد استفاده ۷،۶،۵،۴-تتراهیدروبنزوتیازول-۶،۲-دی آمین و همچنین ۲-هیدروکسی-۱-نفتالدهید از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. در سری آزمایش‌های مطالعه برهم‌کنش با DNA غده تیموس گوساله (ct-DNA)، تریس هیدروکسی متیل آمینومتان، $[(\text{OHCH}_2)_3\text{CNH}_2]$ (Tris-buffer) M.W=121.1 g/mol، از نوع Highly Polymerized Calf Thymus و اتیدیوم برمید $(\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br F.W}=394.3 \text{ g})$ از شرکت سیگما خریداری شده است. محلول فسفات بافر سالین (PBS)، محیط کشت RPMI 1640، سرم جنین گاوی (FBS)، استرپتومایسین $(100 \mu\text{g/ml})$ ، پنی سیلین، آنزیم تریپسین-EDTA، محلول واکنشگر ۳-(۴،۵-دی متیل تیازول-۲-یل)-۲،۵-دی فنیل تترازیولیم برماید (MTT) از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شده است. همچنین، رده‌های سلولی MCF-7 (رده سلولی سرطان سینه انسانی) و HepG2 (رده سلولی سرطان کبد انسانی) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری گردید.

۲-۲- حلال‌ها و گازهای مورد استفاده

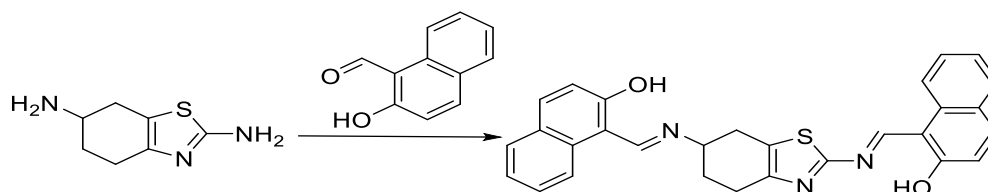
حلال‌های مورد استفاده برای تهیه لیگاند، اتانول، متانول و دی اتیل اتر از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شد. برای تهیه محلول‌های بافر و سایر محلول‌ها از آب دوبار تقطیر شده استفاده گردید.

۲-۳- دستگاه‌های مورد استفاده

برای شناسایی لیگاند سنتز شده، طیف IR توسط دستگاه FT-IR مدل NICOLET FT-IR 100 به صورت قرص KBr و در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شده است. طیف‌های $^1\text{H-NMR}$ توسط دستگاه Bruker DRX-500 AVANCE ثبت شده است. طیف دو رنگ نمایی دورانی توسط دستگاه اسپکتروپلاریمتر Aviv مدل ۲۱۵ در دانشگاه تهران ثبت شد. اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس با اسپکتروفتومتر PerkinElmer LS 45 انجام شده است.

۲-۴- سنتز لیگاند N,N'-بیس(۲-هیدروکسی نفتالیدن)-۷،۶،۵،۴-تتراهیدرو بنزوتیازول-۶،۲-دی آمین

۲ میلی مول از ۲-هیدروکسی نفتالدهید به محلولی از یک میلی مول ۷،۶،۵،۴-تتراهیدروبنزوتیازول-۶،۲-دی آمین در ۵۰ میلی لیتر اتانول اضافه شد. مخلوط مورد نظر به مدت ۵ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تحت رفلکس قرار گرفت. رسوب مورد نظر صاف و با ۱۰ میلی لیتر دی اتیل اتر سرد شستشو داده شد. پس از آن حلال تبخیر و با متانول شستشو داده شد. بازده محصول ۹۰ درصد تعیین گردید. شماتیک این واکنش در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- واکنش سنتز لیگاند

۲-۵- روش تهیه بافر

۳/۵ گرم تریس بافر و ۱/۴۶۲۵ گرم NaCl در یک بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری با آب دو بار تقطیر حل و به حجم رسید. این محلول بافر مادر^۱ می باشد که باید با درب بسته در یخچال نگهداری شود. برای تهیه بافر کار^۲، ۵۰ میلی لیتر از بافر مادر را با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده و pH آن با محلول HCl یک نرمال، ۷/۴ شد. سپس به بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری منتقل و به حجم رسید. این محلول نیز باید در یخچال نگهداری شود.

۲-۶- روش تهیه محلول مادر DNA و تعیین غلظت آن

به منظور تهیه محلول DNA به ازاء هر ۱ میلی لیتر بافر، ۵ میلی گرم DNA جامد پلیمری توزین و در داخل یخچال در حالی که درب ظرف بسته بود، به آرامی به مدت ۷۲ ساعت به کمک مگنت شیشه‌ای هم زده شد تا ژله‌ای همگن گردید. غلظت DNA از رابطه بیر- لامبرت ($A = \epsilon bc$) و طول موج ۲۵۸ nm محاسبه می شود. (ضریب خاموشی DNA، $\epsilon = 6.6 \times 10^3 \text{ nucleotide}^{-1}$) ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$). دقت شود محلول DNA باید خیلی به آرامی هم زده شود و در ظرف درب بسته و در یخچال نگهداری گردد. برای تهیه محلول کار DNA، ۱۸۰ میکرولیتر از محلول مادر DNA در ۱۰ میلی لیتر بافر حل شد تا محلول با غلظت تقریباً ۰/۰۹ میلی مولار از DNA بدست آید.

۲-۷- غیر طبیعی شدن DNA در حضور لیگاند

۲-۷-۱- بررسی نحوه برهم کنش لیگاند باز شیف با بیوماکرومولکول به کمک طیف سنجی فلوئورسانس

از آنجایی که DNA در فلورسانس نشر چندانی ندارد برای تعیین نحوه برهم کنش آن‌ها با دارو از اتیدیوم برمید (EtBr) استفاده می شود. در آزمایش زیر، از محلول‌های مادر (۰/۰۲ mg/mL) EtBr، لیگاند باز شیف (۰/۱ mmol/L) و DNA (۴ mg/mL) استفاده شد. با در نظر گرفتن ماکسیمم بازده کوانتومی اتیدیوم برمید (EtBr) در ۴۷۱ نانومتر، این طول موج برای پرتوی تهییج کل نمونه‌ها در هر دو دما انتخاب شد و اندازه گیری‌های نشر، در سلی که مسیر عبور نور از آن معادل ۱ سانتی متر باشد، در محدوده ۷۰۰-۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. در ابتدا، شدت فلوئورسانس محلول ۲ میکرومولار اتیدیوم برمید (۸۰ میکرولیتر از محلول مادر، اتیدیوم برمید ۵۰ میکرومولار در حجم ۳۶۵ میکرولیتر بافر) در این محدوده از طول موج، ثبت شد.

¹ Stock buffer

² Working buffer

سپس با افزایش غلظت ۶۰ میکرومولار DNA به آن، (۳/۷۳ میکرولیتر از محلول مادر) شدت فلورسانس اتیدیوم به دلیل اینترکلیت شدن آن در بین جفت بازهای DNA به طور قابل توجهی افزایش یافت. سپس این محلول EtBr-DNA با غلظت‌های متفاوتی از لیگاند تیترا شده و پس از هر تزریق، تغییرات شدت فلورسانس EtBr-DNA در حضور لیگاند به صورت جداگانه ثبت شد.

در طیف‌سنجی فلورسانس دو نوع خاموشی وجود دارد: استاتیک (ایستا) و دینامیک (برخوردی) و در هر دو مورد شدت فلورسانس به غلظت خاموش کننده بستگی دارد. خاموشی توسط رابطه زیر که به رابطه استرن-وولمر معروف است بیان می‌شود:

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

در صورتی که خاموشی به صورت برخوردی انجام شود، ثابت استرن-وولمر با K_D بیان می‌شود در غیر این صورت این ثابت با K_{sv} نشان داده می‌شود. اگر مکانیسم خاموشی برهم‌کنش دارو و DNA تنها از نوع استاتیکی یا دینامیکی باشد، در این صورت نمودار F/F_0 برابر غلظت‌های مختلف دارو، خطی خواهد بود، ولی اگر هر دو مکانیسم در برهم‌کنش موثر باشند منحنی مربوطه در غلظت‌های بالای دارو از حالت خطی خارج و به طرف محور x انحناء خواهد یافت. یکی از بهترین روش‌ها برای به دست آوردن ثابت پیوندی و تعداد محل‌های پیوند در برهم‌کنش دارو و بیوماکرومولکول استفاده از رابطه زیر می‌باشد:

$$\log (F_0 - F) / F = \log K_b + n \log [Q]_t$$

با رسم منحنی $\log (F_0 - F) / F$ در برابر $\log [Q]_t$ می‌توان مقادیر n و K را به دست آورد [۱۵].

۲-۷-۲- مطالعه طیف CD و بررسی تغییر ساختار DNA در حضور لیگاند باز شیف

تغییرات ساختار DNA در اثر تابش طول موج‌های ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر در یک سل که مسیر عبور نور از آن یک سانتی‌متر است، مطالعه شد. ابتدا طیف CD محلول ۱۲۰ میکرومولار ct-DNA (۴ میکرولیتر از محلول مادر در ۲۵۰ میکرولیتر بافر) ثبت و نوارهای مربوط به فرم B-DNA شناسایی شد [۱۶]. سپس با افزایش غلظت‌های متفاوتی از لیگاند به آن تغییرات طیف CD که انعکاسی از تغییر ساختار DNA طبیعی می‌باشد (تغییر فرم‌های DNA به هم یا باز شدن دو رشته DNA) بررسی شد. سپس با کم کردن به ترتیب طیف CD مربوط به DNA و DNA-ligand از طیف بافر و لیگاند توسط برنامه نرم افزاری Aviv طیف CD نهایی نتیجه شد.

۲-۸- مطالعات سمیت سلولی

برای کشت سلول مراحل زیر به ترتیب انجام شد. در مرحله اول سلول‌ها دفریز شدند که مراحل کار به شرح زیر است: در ابتدا در یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری حدود ۵ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی حاوی FBS ریخته می‌شود. سپس کرایوپال مربوطه از تانک خارج و سریعاً در آن تا حدی باز گردید تا گاز ازت از آن خارج شود. پس از خروج گاز، در کرایوپال مجدداً بسته شد و

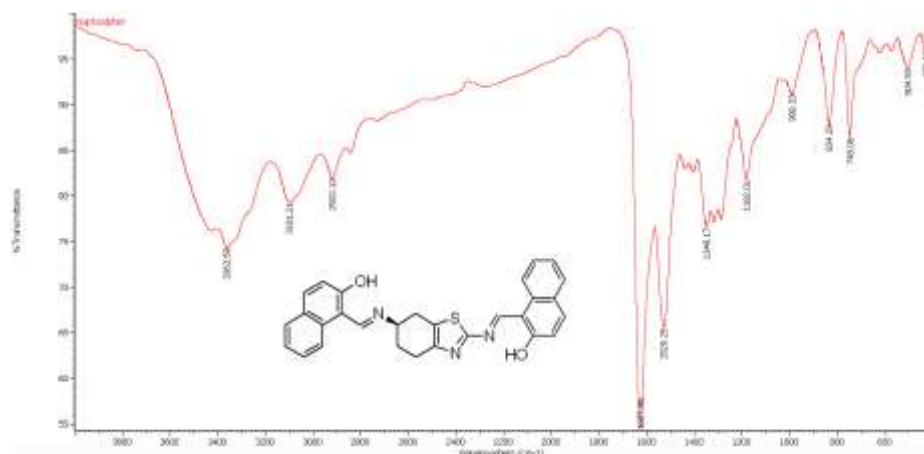
انتهای کرایویوال منجمد حاوی سلول ها در در بن ماری °C ۳۷ قرار داده شد. بلافاصله پس از آنکه بلور منجمد از دیواره داخلی ویال جدا شد، ویال به زیر هود منتقل شد و سوسپانسیون سلولی به صورت قطره قطره در لوله حاوی محیط کامل ریخته و به آرامی پیپتاژ شد. سپس دیواره کرایویوال با یک میلی لیتر محیط شسته و مجدداً به لوله منتقل گردید. سپس لوله حاوی سلول ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از خارج نمودن محیط رویی، یک میلی لیتر محیط تازه حاوی FBS به سلول ها اضافه شد تا به صورت سوسپانسیون درآیند، سرانجام سلول ها شمارش شده و درصد سلول های زنده تعیین می گردند. پس از شمارش، محیط کشت کامل حاوی ۲۵ درصد FBS به سلول ها اضافه شده و سوسپانسیون تهیه شده در داخل فالسک ریخته شد و در انکوباتور قرار گرفت. به این ترتیب سلول ها روند رشد و تکثیر در داخل فلاسک را آغاز کردند. به منظور بررسی بقای سلولی پس از تیمار با یک عامل خارجی صورت می گیرد از آزمون MTT استفاده شد. اساس این تکنیک بر پایه احیای سوبسترای زرد رنگ MTT به رسوب بنفش رنگ فورمازان توسط آنزیم های رداکتاز میتوکندریایی در سلول های زنده است. شدت رنگ تولید شده پس از حل نمودن رسوب فورمازان در حلال های آلی نظیر دی متیل سولفوکسید با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری قابل اندازه گیری می باشد و رابطه مستقیمی با تعداد سلول های زنده دارد. بدین منظور پس از کشت سلول و تریپسینه کردن سلول ها، به مدت ۵ دقیقه محیط حاوی سلول ها سانتریفوژ شد و پس از تخلیه محلول رویی رسوب سلول در ۶ میلی لیتر محیط کشت حل شد و شمارش گردید. سرانجام سلول ها با تعداد بهینه شده (بدست آمده از منحنی استاندارد) در پلیت ۳۶ خانه با حجم نهائی ۲۵۵ میکرولیتر محیط کشت کامل اختصاصی کشت داده شدند و در پلیت ۳۶ خانه در انکوباتور ۳۸ درجه سانتی گراد تحت ۵٪ دی اکسید کربن تا هنگام اتصال سلول ها به سطح فالسک و رسیدن به مورفولوژی نگهداری شد. سپس غلظت های متفاوتی از لیگاند شیف باز به هر چاهک اضافه شد. هر غلظت به صورت تکرار ۳ تائی مورد آزمایش قرار گرفت. سپس ۲۵ میکرولیتر معرف MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر حل شده در بافر PBS به هر چاهک اضافه شد و بلافاصله پلیت ۳۶ خانه در انکوباتور ۳۸ درجه سانتی گراد با ۵٪ دی اکسید کربن به مدت ۴ ساعت نگهداری شد، پس از آن چاهک ها تخلیه گردید و ۲۵۵ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد در آخر نیز جذب سلول در طول موج ۵۸۵ نانومتر اندازه گیری شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- طیف زیر قرمز

طیف زیر قرمز لیگاند باز شیف در محیط KBr و در ناحیه $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شده و در شکل ۲ نشان داده شده است. طیف سنجی FT-IR طیف سنجی کاربردی برای بررسی ساختار شیف بازها می باشد. این امر به ویژه برای تأیید وجود گروه آزومتین و عدم وجود پیوند آلدیدی اصلی (C=O) و ارتعاشات NH_2 بسیار کارآمد است [۱۷]. شاخص ترین خط در طیف

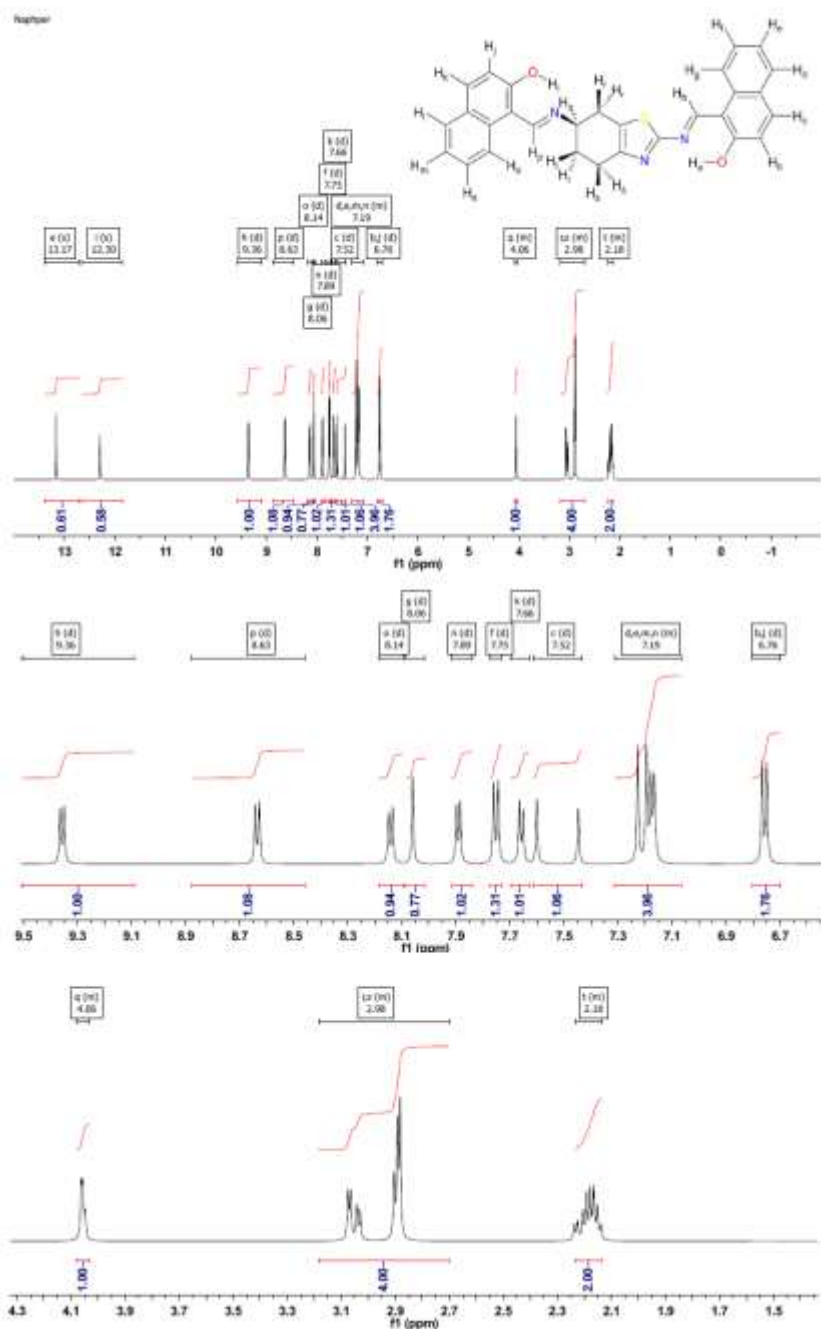
شیف‌بازها مربوط به ارتعاشات کششی VC=N می‌باشد. در طیف لیگاند سنتز شده نوار شاخص VC=N که در ناحیه 1620 مشاهده شد تشکیل گروه ایمینی را تایید می‌کند. حضور چندین باند در محدوده $2800-3100$ حاکی از وجود VC-N پروتون‌های آلیفاتیک و آروماتیک است [۱۸].



شکل ۲- طیف زیر قرمز لیگاند بر روی قرص KBr.

۳-۲- طیف رزونانس مغناطیسی هسته

طیف $^1\text{H-NMR}$ لیگاند سنتز شده در حلال DMSO-d_6 و با بکارگیری CDCl_3 به عنوان استاندارد داخلی ثبت شد. ساختار پیشنهادی و طیف مربوط به لیگاند در شکل ۳ نشان داده شده است. وجود سه نوار سینگلت بین نواحی $12/1$ و $13/2$ به پروتون‌های هیدروکسیل ($-\text{OH}$) حلقه‌های انتهایی نسبت داده می‌شود [۱۸]. دو پیک سینگلت بین نواحی $8/5$ و $9/1$ مربوط به پروتون‌های گروه آزومتین ($-\text{CH=N-}$) مربوط می‌باشد [۱۹].



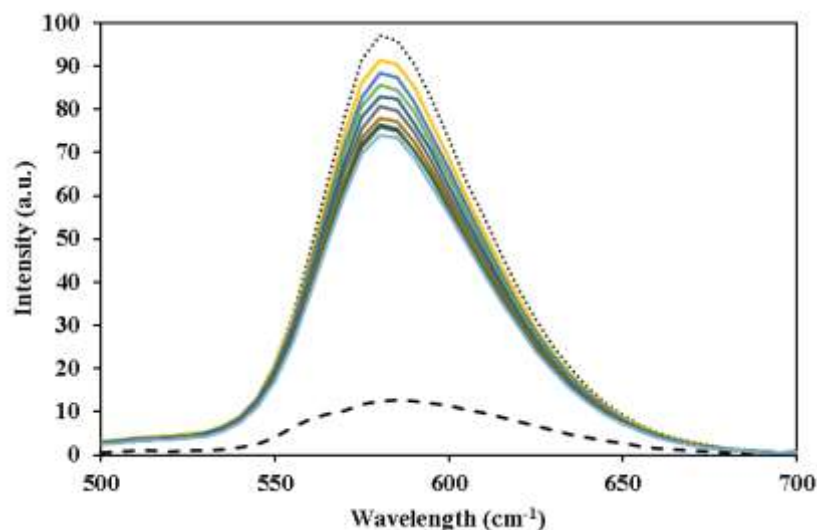
شکل ۳- طیف ¹H-NMR مربوط به لیگاند در حلال DMSO-d₆.

۳-۳- مطالعه برهمکنش لیگاند با ct-DNA به کمک طیف سنجی فلورسانس

۳-۳-۱- بررسی تغییرات شدت فلورسانس EtBr-DNA با افزایش غلظت باز شیف

باتوجه به اینکه مولکول DNA فاقد نشر می‌باشد، امکان مطالعه پیوند لیگاند به آن به کمک طیف‌سنجی فلورسانس در حالت عادی وجود ندارد. بنابراین در این خصوص از مولکول‌هایی که فلوروفور هستند مانند اتیدیوم برمید استفاده می‌شود. از طرفی شدت نشر فلورسانس بیوماکرومولکول می‌تواند بر اثر برهم‌کنش با لیگاند کاهش یابد و میزان کاهش شدت نشر، در

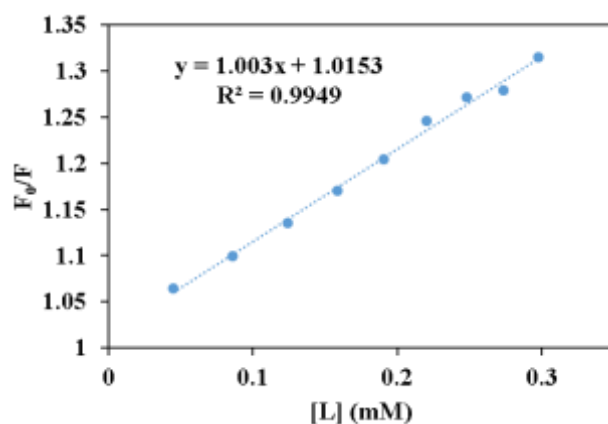
این مطالعات می‌تواند بیانی از نحوه برهم‌کنش دارو با بیوماکرومولکول باشد. در این آزمایش ابتدا شدت نشر اتیدیوم برمید با غلظت ۲ میکرومولار ثبت شد که به صورت خط چین در شکل‌های ۴ نشان داده شده است. سپس با افزایش DNA (با غلظت ۶۰ میکرومولار) افزایش شدت نشر اتیدیوم برمایید مشاهده شد که به صورت نقطه چین در شکل ۴ قابل مشاهده است. سپس این محلول با غلظت‌های متفاوتی از لیگاند در دمای محیط تیترا شد و پس از هر تزریق شدت نشر فلئورسانس در محدوده ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت گردید که در منحنی‌ها مشخص شده‌اند.



شکل ۴- طیف نشر فلئورسانس اتیدیوم برمایید (خط چین) و برهم‌کنش EtBr-DNA در عدم حضور (نقطه چین) و حضور غلظت‌های متفاوت از لیگاند در دمای محیط.

۳-۳-۲- محاسبه ثابت پیوند و تعداد مکان‌های اتصال دارو به DNA با استفاده از رابطه استرن-وولمر

با توجه به رابطه استرن-وولمر ($F_0/F = 1 + k_q\tau_0 [Q] = 1 + K_{sv}[Q]$) و رسم نمودارهای F_0/F در برابر غلظت‌های مختلف لیگاند، K_{sv} یا ثابت استرن-وولمر این برهم‌کنش و k_q یا ثابت خاموشی به دست آمد. مقدار τ_0 زمان خاموشی بیوماکرومولکول‌ها 10^{-8} می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد در صورتی که k_q کوچک‌تر از 2×10^{10} باشد خاموشی از نوع دینامیک و اگر بزرگ‌تر باشد خاموشی استاتیک است [۲۰]. با توجه به نتایج که در جدول ۱ گزارش شده‌اند، لیگاند سنتز شده خاموشی استاتیک دارد یعنی تشکیل کمپلکس DNA-ligand دلیل خاموشی نشرهای فلئورسانس می‌باشد [۲۱]. نمودار استرن-وولمر این ترکیب در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

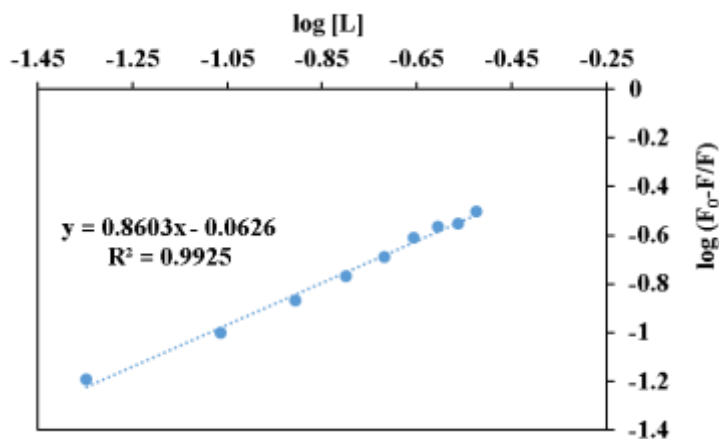


شکل ۵- منحنی استرن-وولمر لیگاند در برهم کنش با اتیدیوم برماید در دمای محیط

همچنین یکی از بهترین روش‌ها برای به دست آوردن ثابت پیوندی و تعداد محل‌های پیوند در برهم کنش دارو با DNA استفاده از رابطه زیر می‌باشد [۲۲]:

$$\log (F_0 - F) / F = \log K_b + n \log [Q]_t$$

با داشتن F_0 و F از آزمایش قبل و رسم منحنی $\log(F_0-F/F)$ در برابر $\log[Com]$ مقادیر n و K_b به دست می‌آید که در جدول ۱ گزارش شده‌اند و منحنی مربوط به آن در شکل ۶ نشان داده شده است. مقادیر n نشان می‌دهد برای لیگاند سنتز شده امکان یک جایگاه پیوندی در DNA به ازاء ۱۰۰۰ نوکلئوتید وجود دارد.



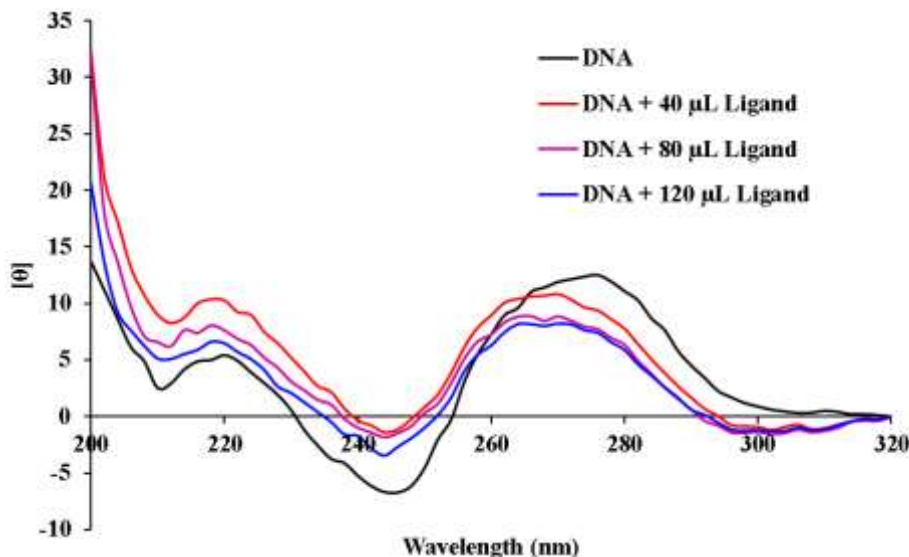
شکل ۶- منحنی تغییرات $\log(F_0-F/F)$ در برابر $\log[Com]$ در دمای محیط

جدول ۱- ثابت خاموشی، ثابت پیوندی و تعداد مکان‌های اتصال لیگاند

| $K_{sv} \times 10^3$ (L/mol) | $k_q \times 10^{11}$ (L/mol) | n | K_b (mM ⁻¹) |
|------------------------------|------------------------------|------|---------------------------|
| ۱ | ۱ | ۰/۸۶ | ۰/۸۶ |

۳-۴- مطالعه طیف CD و بررسی تغییر ساختار ct-DNA در حضور لیگاند

یکی از روش‌های قوی در بررسی ساختار بیوماکرومولکول‌ها و همچنین مطالعه برهم‌کنش آن‌ها با ترکیبات دارویی طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی می‌باشد. طیف دورنگ‌نمایی دورانی روشی مناسب برای تعیین تغییرات ساختار DNA است و به کوچک‌ترین تغییرات ساختاری DNA که بر اثر اتصال مولکول‌های کوچک ایجاد می‌شود حساس می‌باشد. در طیف CD، DNA، دو نوار در ۲۷۲ و ۲۴۵ نانومتر مشاهده می‌شود که نوار مثبت در ۲۷۲ نانومتر، مربوط به جفت شدن بازهای هتروسیکل DNA دو رشته‌ای و نوار منفی در ۲۴۵ نانومتر، ناشی از پیچش دو رشته DNA می‌باشد [۲۳]. این دو نوار نشان دهنده فرم B-DNA می‌باشند. در این آزمایش به محلول ۱۲۰ میکرومولار DNA، غلظت‌های متفاوت از لیگاند اضافه شد و طیف دورنگ‌نمایی دورانی آن در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. طیف دورنگ‌نمایی دورانی DNA در عدم حضور و حضور لیگاند در غلظت‌های مختلف در شکل ۷ نشان داده شده‌اند.



شکل ۷- طیف دورنگ‌نمایی دورانی DNA ۱۲۰ میکرومولار و DNA-Ligand با غلظت‌های مختلف (بر حسب میکرولیتر) از لیگاند در دمای محیط همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود در طیف CD تغییرات در دو نوار مشاهده شده است اما این تغییرات چشمگیر نمی‌باشد به طوری که تغییر فرم DNA رخ نمی‌دهد و در نتیجه DNA به فرم اولیه خود باقی می‌ماند. به طور کل امکان اتصال شیاری به DNA در فرم B و Z امکان‌پذیر است.

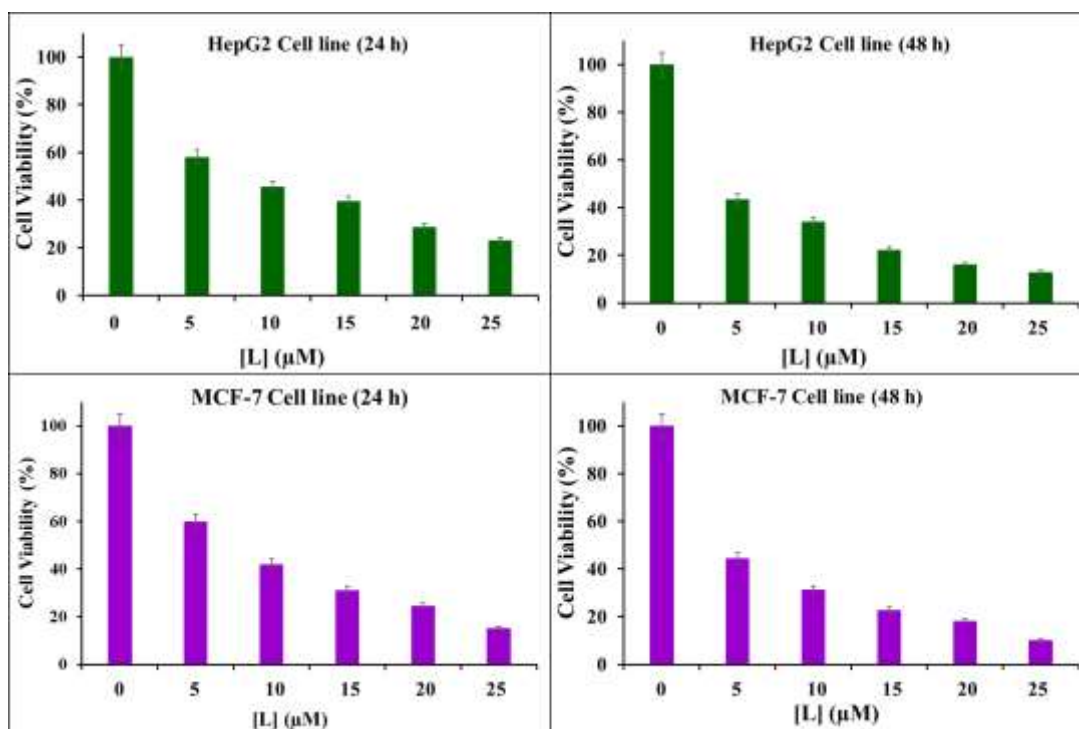
۳-۵- بررسی سمیت سلولی

سمیت سلولی ترکیب باز شیف تهیه شده بر روی دو رده سلول سرطانی انسانی MCF-7 و HepG2 با استفاده از روش‌های مبتنی بر تست MTT مشخص شد که در شکل ۹ نشان داده شده‌اند و مقادیر IC_{50} محاسبه شده آن‌ها در جدول ۲ گزارش شده است. این ترکیب فعالیت سمیت سلولی را در برابر هر دو رده سلول سرطانی به صورت وابسته به غلظت نشان داد. مقادیر

IC₅₀ این ترکیب برای دو رده سلولی HepG2 و MCF-7 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۳۴/۵۲ ± ۲/۲۱ و ۷/۷۵ ± ۳/۷۰ میکرومولار می‌باشد. با افزایش غلظت از ۵ تا ۲۵ میکرومولار، افزایش سمیت در برابر رده‌های سلولی MCF-7 و HepG2 برای این باز شیف مشاهده شد.

جدول ۲- مقادیر IC₅₀ محاسبه شده از اثرگذاری ترکیب باز شیف سنتز شده بر روی HepG2 و MCF-7 در محدوده غلظت ۵-۲۵ میکرومولار از ترکیب باز شیف بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون

| In vitro Cytotoxicity IC ₅₀ (μM) | | | |
|---------------------------------------------|--------------|----------------|-------------|
| 24 h incubated | | 48 h incubated | |
| MCF-7 | HepG2 | MCF-7 | HepG2 |
| 7.75 ± 3.70 | 34.52 ± 2.01 | 3.01 ± 2.71 | 1.29 ± 3.07 |



شکل ۸- مقایسه درصد میانگین سلول‌های زنده HepG2 و MCF-7 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب باز شیف و سلول‌های بدون اثر به عنوان کنترل بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش لیگاند باز شیف N' و N - بیس (۲- هیدروکسی نفتالیدین) ۷،۶،۵،۴-تتراهیدرو- بنزوتiazول-۲،۶- دی آمین سنتز و توسط روش های طیف سنجی از قبیل IR و NMR شناسایی شد. سپس برهمکنش آن با DNA از نظر مولکولی به کمک تکنیک‌های فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی مورد مطالعه قرار گرفت. فلئورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار و

خصوصیات اتصالی ماکرومولکولها می باشد. روند تغییرات شدت فلئورسانس EtBr-DNA در حضور غلظت‌های متفاوت از لیگاند نشان داد که این ترکیب قادر به کاهش شدت نشر فلئورسانس EtBr-DNA بوده و نوع خاموشی آن استاتیک می باشد. تکنیک دورنگ نمایی دورانی (CD) یک روش ایده آل برای مطالعه تغییر کانفورماسیونی DNA ناشی از تغییر پارامترهایی مثل pH، دما، اتصال و غیره می باشد. با افزایش غلظت‌های متفاوتی از لیگاند، طیف‌های CD مثبت و تغییرات ساختار مولکول DNA بررسی شد. نتایج نشان داد که اتصال لیگاند به DNA موجب کاهش یا افزایش در شدت هر دو نوار شده است اما این تغییرات تغییری در فرم DNA ایجاد نکرده است. نتایج حاصل از MTT نشان می دهد که بقای سلول‌های HepG2 و MCF-7 وابسته به غلظت باز شیف می باشد. به طوری که غلظت‌های بالاتر از این باز شیف مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین تر آن می باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه تهران بابت حمایت مادی و معنوی این کار تشکر می کنند.

۶- مراجع

- [1] H. Puchtler and S. Meloan, *Histochemistry* **72** (1981) 321.
- [2] S. Meghdadi, M. Amirnasr, M. Majedi, M. Bagheri, A. Amiri, S. Abbasi and K. Mereiter, *inorg. Chim. Acta* **437** (2015) 64.
- [3] S.M. Bensaber, H. Allafe, N.B. Ermeli, S.B. Mohamed, A.A. Zetrini, S.G. Alsabri, M. Erhuma, A. Hermann, M.I. Jaeda and A.M. Gbaj, *Med. Chem. Res.* **23** (2014) 5120.
- [4] N. El-wakiel, M. El-Keiy and M. Gaber, *Spectrochimica Acta Part A: Spectrochim. Acta A* **147** (2015) 117.
- [5] M. Salehi, M. Kubicki, M. Jafari, M. Galini and F. Soleminani, *J. Appl. J. Chem.* **54** (2020) 315-330.
- [6] Z. Abbasi, M. Salehi and A. Khaleghian, *Appl. J. Appl. J. Chem.* **49** (2019) 103-116.
- [7] A. Jarrahpour, D. Khalili, E. De Clercq, C. Salmi and J.M. Brunel, *Molecules* **12** (2007) 1720.
- [8] W. Rehman, M.K. Baloch, B. Muhammad, A. Badshah and K.M. Khan, *Sci. Bull* **49** (2004) 119.
- [9] A.A. Shanty, J.E. Philip, E.J. Sneha, M.R.P. Kurup, S. Balachandran and P.V. Mohanan, *Bioorg. Chem.* **70** (2017) 67.
- [10] H. Karimi-Maleh, A. Fallah Shojaei, F. Karimi, K. Tabatabaeian and s. shakeri, *J. Nanostructures* **8** (2018) 217.
- [11] D. Agudelo, P. Bourassa, G. Berube and H.A. Tajmir-Riahi, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **158** (2016) 274.
- [12] A. D. Richards and A. Rodger, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 471.

- [13] K. Jana, T. Maity, T.S. Mahapatra, P.K.D. Mohapatra, S.C. Debnath, S. Das, M. Hossain and B.C. Samanta, *Transition Met. Chem.* **42** (2017) 69.
- [14] Z. Shokohi-Pour, H. Chiniforoshan, M.R. Sabzalian, S.A. Esmaili and V. Momtazi-borojeni, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36** (2017) 1.
- [15] M. Eslami Moghadam, A. Divsalar, A. Abolhosseini Shahrnoy and A. A. Saboury, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34** (2016) 1751.
- [16] N. Zaidi, S. Nusrat, F. K. Zaidi and R. H. Khan, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014) 13025.
- [17] M. Salehi, M. Kubicki, M. Galini, M. Jafari and R. E. Malekshah, *J. Mol. Struct.* **1180** (2019) 595.
- [18] M. Galini, M. Salehi, M. Kubicki, A. Amiri and A. Khaleghian, *Inorganica Chim. Acta* **461** (2017) 167.
- [19] T. Tomasic, M. Mirt, M. Barancokova, J. Ilas, N. Zidar, P. Tammela and D. Kikelj, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 338.
- [20] S. Mandal, S. Mandal, D. K. Seth, B. Mukhopadhyay and P. Gupta, *Inorganica Chim. Acta* **398** (2013) 83.
- [21] H. Mahaki, H. Tanzadehpanah, O. K. Abou-Zied, N. H. Moghadam, A. Bahmani, S. Salehzadeh, D. Dastan and M. Saidijam, *Process Biochem* **79** (2019) 203.
- [22] A. Divsalar, A. A. Saboury, H. Mansoori-Torshizi, M. M. Eslami, F. Ahmad and G. H. Hakimelahi, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **26** (2009) 587.
- [23] A. Holm and S. Ivalu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** (2010) 9581.