

سنتز، شناسایی و ارزیابی برهم کنش DNA با کمپلکس جدیدی از نقره (I) با

لیگاندهایی بر پایه دی آزا فلورن : مطالعه تجربی و نظری

الهه موحدی، حافظ رزم آزما، علیرضا رضوانی*، علیرضا نوروزی*

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۲

تاریخ تصحیح: ۹۹/۰۹/۰۳

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۲۱

چکیده

در این پژوهش کمپلکس چهار کوئوردینه‌ای جدید نقره (I) با لیگاندهای کی‌لیت N -دهنده با فرمول، $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ (که ۵،۴-دی آزا فلورن-۹-اون L_1 و N -۵،۴-دی آزا فلورن-۹-بیلدین) آنیلین L_2 تهیه شده و به وسیله روش‌های طیف‌سنجی (UV-Vis، FT-IR و 1H NMR)، تجزیه عنصری و هدایت مولی مورد شناسایی قرار گرفته است. نحوه اتصال این کمپلکس به DNA با تیتراسیون جذب الکترونی، تیتراسیون لومینسانس و مطالعات ترمودینامیکی بررسی و ارتباط میان ساختار و خواص زیستی این ترکیب مورد بحث قرار گرفته است. ثابت‌های پیوند (K_b) در دماهای مختلف و پارامترهای ترمودینامیکی (تغییرات انتالپی، انتروپی و انرژی آزاد گیبس) محاسبه شده‌اند. مطالعات تئوری ساختار کمپلکس در چارچوب روش تابعی چگالی (DFT)، ژئومتری چهاروجهی را برای اتم مرکزی نقره (I) در حفره کوئوردیناسیونی N_4 پیش بینی کرده‌اند. داکینگ مولکولی به منظور تعیین حالت اتصال و بهترین جهت‌گیری کمپلکس با DNA انجام گرفته است. نتایج تجربی و نظری نشان می‌دهند که اتصال کمپلکس نقره (I) به CT-DNA با جای‌گیری قسمتی از لیگاندهای مسطح میان بازهای DNA دورشته‌ای با قدرت اینترکالیته شدن متوسط و ثابت پیوند $1.66 \times 10^5 M^{-1}$ انجام می‌شود.

کلمات کلیدی: نقره (I)، دی آزا فلورن، برهم کنش با CT-DNA، تکنیک‌های طیف‌سنجی، مطالعات تئوری.

۱- مقدمه

در گزارش اخیر مجله Nature، بیماری سرطان بر همه عوامل مرگ‌ومیر مثل بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های عروقی مغزی، HIV / AIDS، عفونت‌های تنفسی از جمله ذات‌الریه، مالاریا، و سیروز و همچنین تصادفات جاده‌ای پیشی گرفته است [۱]. سرطان یا نئوپلاسم (تومور)، تکثیر کنترل نشده سلول‌های غیر طبیعی می‌باشد که می‌تواند بافت‌های مجاور را درگیر و از طریق جریان خون یا لنف به سایر نقاط بدن گسترش یابد. اصطلاح شیمی درمانی به استفاده از داروهای شیمیایی برای نابودی گزینشی سلول‌های توموری یا دست کم ممانعت از تکثیر آن‌ها اطلاق می‌شود.

* نویسنده مسئول: استاد تمام دانشکده علوم پایه دانشگاه سیستان و بلوچستان

Ali@hamoon.usb.ac.ir

* نویسنده مسئول: دانشیار دانشکده علوم پایه دانشگاه سیستان و بلوچستان

Anowroozi@chem.usb.ac.ir

این داروهای ضد سرطانی را می‌توان با توجه به مکانیسم عملکرد آن‌ها، به عوامل برهم‌کنش‌کننده با دئوکسی‌ریبونوکلیک اسید (DNA)، ترکیبات متوقف‌کننده متابولیسم سلولی، داروهای ضد توبولین، عوامل هدف‌گیری مولکولی، هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و سایر عوامل بیولوژیکی طبقه‌بندی کرد [۲]. عوامل برهم‌کنش‌کننده با DNA یکی از بزرگترین و مهم‌ترین خانواده‌های داروهای ضد سرطان برای شیمی‌درمانی هستند. از ابتدای قرن بیستم تلاش برای استفاده از کمپلکس‌های فلزی به‌عنوان عوامل بسیار موثر بیولوژیکی در شیمی‌درمانی آغاز شد. این ترکیبات رابطی میان شیمی معدنی، داروسازی، بیوشیمی و سم‌شناسی هستند که بر داروهای آلی قدیمی پیشی گرفته‌اند، زیرا جنبه‌هایی از عملکرد دارویی کمپلکس‌های معدنی وجود دارند که با مواد آلی محقق نمی‌شوند. ثابت شده است که وقتی کمپلکس‌شدن روی می‌دهد، فعالیت ضدسرطانی لیگاند افزایش می‌یابد. تنوع اعداد کوئوردیناسیون، ژئومتری‌های مختلف، حالت‌های اکسایش، خواص ترمودینامیکی و سینتیکی و خواص ذاتی یون‌های فلزی و لیگاندها در انجام انواع مختلف واکنش‌ها موثر هستند [۳].

توجه بسیار زیاد به کمپلکس‌های معدنی به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای داروهای شیمی‌درمانی با کشف داروی سیس‌پلاتین و مشتقاتش به اوج خود رسید [۴]. سیس‌دی‌آمین‌دی‌کلروپلاتینیوم (II) یا سیس‌پلاتین، اولین داروی ضدسرطان حاوی پلاتینیوم موفق در مرحله کلینیکال بود که برای درمان سرطان‌های مختلف نظیر بیضه، تخمدان، تومورهای تروفوبلاستی بارداری، سرطان ریه و گردن رحم، مری و... مورد استفاده قرار گرفت. این دارو قابلیت اتصال به DNA سلولی، توقف فرایند تکثیر و ایجاد آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) را دارد. با این حال این ترکیب معایبی دارد که از آن جمله می‌توان به حلالیت کم، مقاومت ذاتی یا اکتسابی در مقابل برخی از انواع سرطان، و همچنین اثرات جانبی محدودکننده دوز دارو از جمله تهوع، سمیت عصبی و سمیت کلیوی اشاره کرد [۵]. این مشکلات لاینحل باعث شده است طراحی و سنتز ترکیبات معدنی جدید با رویکرد به حداقل رساندن اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی و بالا بردن کارایی در هدف قراردادن سلول سرطانی، در دستور کار شیمی‌دانان معدنی قرار بگیرد. بیشتر این داروهای معدنی ترکیباتی هستند که مستقیماً DNA برهم‌کنش می‌کنند و مکانیسم آن‌ها ممانعت از سنتز DNA به‌خاطر نقش عمده آن در رونویسی سلولی می‌باشد. در کمپلکس‌های معدنی انواع پارامترها مانند سایز، ساختار و جهت‌گیری لیگاندها در کره کوئوردیناسیون فلز مرکزی روی توانایی برهم‌کنش آن‌ها با DNA تاثیر می‌گذارد. کاربرد ترکیبات کوئوردیناسیونی لیگاند مرکب نیز اجازه تغییر در سایز، بار، ساختار، آب‌گریزی و میزان توانایی در ایجاد پیوند هیدروژنی کمپلکس‌ها را می‌دهد که می‌تواند نحوه برهم‌کنش را به کلی تغییر دهد. برای طراحی داروی شیمی‌درمانی مناسب، ضروری است همه اطلاعات درمورد ماهیت برهم‌کنش‌های کمپلکس‌های معدنی با DNA که منجر به غیرطبیعی شدن، متراکم شدن، تجمع یا رسوب DNA می‌شوند، جمع‌آوری شود. تشخیص نوع برهم‌کنش DNA-کمپلکس فلزی اهمیت ویژه‌ای در درک اساس مولکولی فعالیت‌های درمانی دارد و این توانایی آن‌ها تحت تاثیر ژئومتری کوئوردیناسیون، نوع یون فلزی و اتم‌های دهنده

در ساختار لیگاند می‌باشند [۶، ۷]. در برهم‌کنش کمپلکس فلزی با DNA، چندین احتمال وجود دارد، این برهم‌کنش‌ها می‌توانند یکی از برهم‌کنش‌های کووالانسی (کوئوردیناسیونی) و انواع برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی (اینترکیلیت شدن، شیاری، الکترواستاتیک و پیوند هیدروژنی) باشند و یا مجموعی از این برهم‌کنش‌ها اتفاق بیافتد [۸-۱۰].

برای طراحی چنین داروهای جدید معدنی با خواص بهتر و گزینش پذیری بالاتر، نیاز است کمپلکس معدنی مذکور دارای فلز و لیگاند مناسب برای برهم‌کنش کنترل شده با ماکرومولکول‌های زیستی باشد. لیگاندهای توانا در مهم‌ترین نوع برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی DNA-کمپلکس فلزی یا فرایند اینترکیلیت شدن، معمولاً مسطح و آروماتیک هستند تا فرایند اینترکیلیت شدن تا جای‌گیری^۱ میان بازهای DNA را به کمک ساختار خاص خود انجام دهند [۱۱]. علاوه بر این خاصیت، انتخاب لیگاندهای با فعالیت زیستی اثبات شده و کمترین میزان سمیت در اولویت طراحی داروهای بالقوه ضدسرطان می‌باشد. از این رو شیف‌بازها^۲ بخاطر فعالیت زیستی و خواص ضدسرطانی بسیار مورد مطالعه قرار می‌گیرند [۱۲]. مشتقات زیادی از ۱،۱-فنانترویلین و ۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-اون (L_۱) به‌خاطر اینترکیلیت شونده‌گی به DNA مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۳] و تلاش‌های زیادی برای بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی سیستم π لیگاندهای خانواده فنانترویلین با اصلاح شیمیایی لیگاند انجام گرفته است [۱۴]. در این میان لیگاند N-(۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-بیلدین) آنیلین کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، به علل گفته شده و شیمی منحصر به فرد لیگاندهای خانواده مشتقات فنانترویلینی، کمپلکسی از این لیگاندها با فلز مرکزی نقره (I) انتخاب شده است و اختصاصاً خواص زیستی آن در برهم‌کنش با DNA مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاهوری

مواد شیمیایی مورد استفاده در کلیه مراحل، دارای درجه خلوص کافی بوده و یا به روش مناسب خالص سازی شده‌اند. مواد اولیه از شرکت مرک و نمک سدیمی دئوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید تیموس گوساله (نوع I) از شرکت سیکما خریداری شده‌اند. در تمام واکنش‌ها از آب دوبار تقطیر برای تهیه محلول‌های آبی استفاده گردیده است. لیگاند ۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-اون (L_۱) به روش هندرسون [۱۵] تهیه شد و سپس از آن، لیگاند N-(۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-بیلدین) آنیلین (L_۲) طبق مراجع تهیه شد [۱۶]. کلیه بررسی‌های برهم‌کنش کمپلکس فلزی با DNA در محلول تریس بافر- HCl (۵mM) تریس‌هیدروکسی متیل آمینومتان و ۵۰mM سدیم کلراید که pH آن با HCl به ۷/۲ رسیده است) انجام شد. CT-DNA در بافر تریس، طی دو شب در دمای ۴°C حل و نگهداری شد. برای تعیین غلظت دقیق محلول کار DNA، جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر

¹ Insertion

² Schiff Base

اندازه‌گیری و غلظت آن با استفاده از قانون بیر-لامبرت محاسبه گردید. ضریب جذب مولی در 260 nm برای $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 6600 می‌باشد [17]. نسبت جذب محلول DNA در دو طول موج 260 به 280 نانومتر بیشتر از $1/8$ بود که نشان از خلوص و عاری بودن از پروتئین را دارد [18]. محلول غلیظ 1×10^{-3} مولار کمپلکس نقره (I) در محلول 5% دی متیل سولفوکساید در آب دوبار تقطیر تهیه شده است. سپس از این محلول غلیظ در هر یک از مراحل، محلول‌های کار کمپلکس تهیه گردیده اند. با استفاده از این روش، مقدار DMSO باقیمانده در محلول‌ها به کمتر از $0/1$ درصد حجمی-حجمی می‌رسد.

نتایج آنالیز عنصری (CHN Microanalysis) برای اندازه‌گیری محتوای کربن، هیدروژن و نیتروژن به وسیله دستگاه Eager Summarize elemental analyzer 300 بدست آمد. هدایت مولی ($\text{ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) در دمای اتاق توسط Systronics Conductivity Bridge 305 با استفاده از یک سل هدایت سنجی با ثابت سل $0/1$ اندازه‌گیری شد. طیف‌های IR قرص KBr نمونه توسط اسپکترومتر FT-IR JASCO 680-PLUS در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب در دمای اتاق توسط اسپکترومتر Bruker 300MHz Avance III ثبت شده اند. طیف‌های الکترونی UV-Vis توسط اسپکتروفوتومتر دوپرتویی UV-JASCO-570 و سل کوارتزی به قطر 1 cm به‌دست آمده‌اند. طیف‌های نشری با اسپکتروفلوریمتر Varian مدل Cary Eclips مجهز به ترموستات برای تثبیت دما ثبت شده‌اند.

۲-۲- تهیه کمپلکس (N)-(5,4-دی‌آزافلورن-۹-یلیدین) آنیلین (5,4-دی‌آزافلورن-۹-اون) نقره (I) نیترات $[\text{Ag}(\text{L}_1)(\text{L}_2)]\text{NO}_3$

برای تهیه کمپلکس در یک بالون مجهز به همزن مغناطیسی، در دمای 50°C ، مقدار 5 میلی لیتر محلول گرم اتانولی نقره نیترات ($0/17$ گرم؛ یک میلی مول) و 5 میلی لیتر محلول اتانولی لیگاند L_2 (N)-(5,4-دی‌آزافلورن-۹-یلیدین) آنیلین؛ $0/26$ گرم/ 1 میلی مول) مخلوط شده اند، به محلول زرد پررنگ حاصل پس از نیم ساعت هم زدن در همان دما، قطره قطره ($0/18$ گرم/ 1 میلی مول) لیگاند L_1 (5,4-دی‌آزافلورن-۹-اون) در حداقل اتانول افزوده شده است. پس از مدتی رسوب زرد روشنی تشکیل گردیده که پس از یک ساعت هم زدن مخلوط در دمای اتاق رسوب، صاف و با اتانول سرد شستشو داده شده تا اجزای واکنش نداده کاملاً از محصول جدا شوند. بازده محصول حدود 51 درصد به‌دست آمده است. کمپلکس حاصل با روش های طیف سنجی (UV-Vis، FT-IR و $^1\text{H-NMR}$)، آنالیز عنصری و هدایت مولی شناسایی شده است. نتایج آنالیز عنصری ترکیب $\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{AgN}_6\text{O}_4$ (وزن مولکولی $609/34$): محاسبه شده (C: $5/19$ ، H: $2/81$ ، N: $13/79$ تجربی (C: $5/57$ ، H: $2/95$ ، N: $13/54$ می‌باشد).

۲-۳- روش محاسباتی

به منظور درک بهتر ساختار هندسی کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ ، نخست ساختار هندسی کمپلکس با نرم افزار Gauss View 5.0.8 رسم شده و سپس محاسبات بهینه سازی ساختاری بدون اعمال هیچ گونه محدودیت های تقارنی در چارچوب نظریه تابعی چگالی (DFT) با نرم افزار Gaussian 09 انجام گرفته است [۱۹]. مطالعات نظری برپایه تابع هیبریدی B3LYP و مجموعه پایه LanL2DZ برای اتم نقره (با استفاده از کلید واژه GEN) و مجموعه پایه 6-31+G (d) برای اتم های دیگر انجام شده است. علاوه بر این فرکانس های ارتعاشی کمپلکس یاد شده مورد ارزیابی قرار گرفته و هیچ گونه فرکانس منفی برای کمپلکس مشاهده نشده است. انرژی برهم کنش بین مولکولی (ΔE_{int}) با ارزیابی اختلاف بین انرژی کل کمپلکس و مونومرهای مجزا محاسبه شده و در معادله ۱ نشان داده شده است:

$$\Delta E_{int} = E_{complex} - \sum E_{monomer} \quad (1)$$

برای تعیین جایگاه ویژه اتصال، حالت اتصال و بهترین جهت گیری کمپلکس سنتز شده در برهم کنش با DNA، به عنوان گیرنده هدف، از روش داکینگ مولکولی استفاده شده است. برای این منظور ابتدا ساختار کریستالوگرافی DNA با شماره 1N37 از بانک اطلاعات پروتئین (PDB : Protein Data Bank) گرفته و سپس با حذف لیگاند و افزودن هیدروژن های قطبی و بار به آن برای داکینگ مولکولی استفاده شده است. کمپلکس نیز با مشخص کردن بارهای جزئی و پیوندهای قابل چرخش برای انجام محاسبات آماده شده است. برای انجام داکینگ اندازه شبکه ۰/۳۷۵ آنگستروم و جعبه شبیه سازی با ابعاد ۵۰×۵۰×۹۰ آنگستروم مکعب به ترتیب برای X, Y, Z به کار رفته اند. در این شبیه سازی از الگوریتم ژنتیک لامارکین استفاده گردیده است و سایر پارامترها بصورت پیش فرض در نظر گرفته شده اند. در محاسبات داکینگ ۱۰۰ صورت بندی شبیه سازی شده و پس از آن بهترین صورت بندی با کمترین میزان انرژی اتصال به عنوان صورت بندی پایدار انتخاب گردیده است. برای انجام محاسبات داکینگ مولکولی نرم افزار AutoDock Tools 1.5.6 مورد استفاده قرار گرفته است.

۲-۴- برهم کنش با CT-DNA

۲-۴-۱- بررسی برهم کنش کمپلکس با DNA به وسیله طیفسنجی جذبی UV-Vis در دمای اتاق و محاسبه ثابت پیوند (K_b) در این آزمایش محلول $7/5 \times 10^{-7}$ کمپلکس تهیه و جذب ۳ میلی لیتر از آن در محدوده ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر ثبت شده است. همزمان از یک سل شاهد حاوی آب و دی متیل سولفوکساید (دقیقا با درصد حجمی استفاده شده برای انحلال نمونه کمپلکس) استفاده گردیده است. سپس طیف گیری با تزریق مقادیر متفاوت محلول DNA با غلظت $5/8 \times 10^{-3}$ مولار به هر دو سل نمونه و شاهد انجام گرفته است ($[DNA] = 1/1 \times 10^{-6} - 6/6 \times 10^{-6} M$). تغییر شدت جذب محلول کمپلکس در حضور غلظت های مختلف DNA ثبت شده است.

۲-۴-۲- محاسبه ثابت پیوند (K_b) بین DNA و کمپلکس در دمای اتاق به وسیله طیف‌سنجی جذبی UV-Vis

برای محاسبه ثابت پیوند با استفاده از داده‌های بخش ۱-۵-۱، از معادله ولف-شایمر (۲) استفاده شده است [۲۰]. با رسم نمودار $[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ بر حسب $[DNA]$ و محاسبه شیب و عرض از مبدا می‌توان ثابت پیوند را به دست آورد.

$$(۲) \quad [DNA] / \epsilon_a - \epsilon_f = [DNA] / \epsilon_b - \epsilon_f + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

در این معادله ϵ_a (ضریب خاموشی کمپلکس پیوند داده با DNA است که از تقسیم مقدار جذب مشاهده شده بر غلظت کمپلکس محاسبه می‌شود)، ϵ_f (ضریب خاموشی کمپلکس در حالتی که با DNA پیوند نداده است)، ϵ_b (ضریب خاموشی کمپلکس در حالتی که کاملاً با DNA پیوند داده است) و K_b ثابت پیوند می‌باشند. با رسم نمودار $[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ بر حسب $[DNA]$ و محاسبه شیب و عرض از مبدا می‌توان ثابت پیوند را به دست آورد.

۲-۴-۳- مطالعه برهم‌کنش کمپلکس با DNA به روش طیف‌سنجی فلوریمتری در دماهای مختلف

برای شروع این مطالعه، نیاز به اطلاعات طیف جذبی کمپلکس می‌باشد. براساس آن طول موج برانگیختگی ۲۶۰ نانومتر انتخاب و نشر آن در حضور و عدم حضور DNA در محدوده ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفته است. غلظت بهینه مورد استفاده برای کمپلکس در این بررسی با توجه به داده‌های طیف‌سنجی جذبی و مطالعه اثر غلظت بر شدت فلورئورسانس ترکیب انتخاب می‌شوند، برای این کمپلکس، غلظت 1×10^{-5} مولار با بیشترین شدت نشر در محدوده طول موجی موردنظر انتخاب گردیده است. سپس ۳ میلی لیتر از آن درون سل فلورئورسانس ریخته و طیف نشری آن ثبت شده است. سپس طیف‌گیری در حضور مقادیر مختلف از محلول DNA با غلظت $5/8 \times 10^{-3}$ مولار انجام گرفته است (به طوری که $[DNA] = 0 - 1/21 \times 10^{-5} M$) و پس از هر بار تزریق، طیف نشری ثبت شده است. به منظور تعیین نوع برهم‌کنش کمپلکس و DNA این آزمایش در سه دما برای هر کمپلکس تکرار ارائه شده است.

۲-۴-۴- محاسبه ثابت پیوند (K_b) برهم‌کنش DNA با کمپلکس

می‌توان ثابت پیوند (K_b) را با استفاده از داده‌های فلورئورسانس محلول‌ها از بخش ۱-۵-۳ در غیاب و حضور DNA و به‌کارگیری معادله ۳ به دست آورد [۲۱]. با رسم منحنی $\log(F_0 - F)/F$ بر حسب $\log [Q]$ یک خط راست به دست می‌آید که شیب آن برابر با n و عرض از مبدا آن $\log K_b$ است.

$$\text{Log } (F_0 - F)/F = \log K_b + n \log [Q] \quad (۳)$$

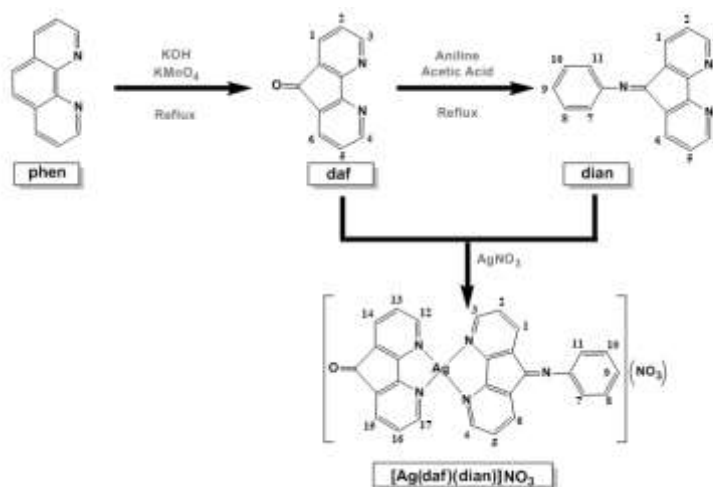
که در آن F_0 و F به ترتیب شدت‌های فلورئورسانس در حضور و عدم حضور خاموش‌کننده، $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده می‌باشد. K_b ثابت پیوند و n تعداد جایگاه‌های اتصال را نشان می‌دهد که به ترتیب از شیب و عرض از مبدا نمودار خطی $\log [(F_0 - F)/F]$ بر حسب $\log [Q]$ قابل محاسبه است.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- سنتز و آنالیز ساختاری لیگاندها و کمپلکس نقره (I)

روش تهیه لیگاند و کمپلکس نقره (I) در شکل ۱ آمده است. لیگاندها طبق روش‌های موجود در مراجع سنتز شده اند [۲۲، ۱۵] و به طور کامل به وسیله یافته‌های طیف سنجی و بلورنگاری شناسایی شده اند. ساختار لیگاند L_۱ در سال ۱۹۹۴ توسط راوی کومار و همکارانش [۲۳] تعیین شد. شکل ۲(الف) نشان می‌دهد که حلقه‌های پیریدینی در لیگاند L_۱ با هم زاویه ۰/۹ درجه می‌سازند، هرچند در کل می‌توان آن را مولکولی مسطح در نظر گرفت. ساختار بلوری لیگاند L_۲ مطابق آن چه در شکل ۲(ب) دیده می‌شود در سال ۲۰۰۸ توسط کنگ و همکارانش [۲۴] گزارش گردید، که در آن گروه ۵،۴-دی‌آزافلورنیلیدین موجود در لیگاند، تقریباً مسطح می‌باشد و با زاویه ۷۵/۷۵ درجه نسبت به حلقه فنیلی قرار گرفته است. اگرچه تلاش برای بدست آوردن بلور مناسب جهت آنالیز بلورنگاری اشعه X برای کمپلکس نقره (I) تهیه شده بی‌نتیجه ماند، اما داده های تجزیه‌ای، طیفی و روش‌های محاسباتی امکان پیش‌بینی ساختار ممکن را فراهم می‌کنند (شکل ۷و). همینطور این نتایج در توافق با فعالیت بیوشیمیایی کمپلکس بود، چون واضح است که نحوه برهم‌کنش با DNA و خواص زیستی کمپلکس‌های فلزی از ویژگی‌های ساختاری آن‌ها ناشی می‌شود.

ثابت شده است که یون نقره (I) با آرایش الکترونی d^{۱۰} ارجحیت خاصی برای ژئومتری کوئوردیناسیونی معینی نشان نمی‌دهد. پیشتر ساختار کمپلکس‌های متعددی از نقره (I) با ۱۰،۱-فنانترولین [۲۵] و مشتقات آن مانند ۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-اون [۲۶] و ۱۰،۱-فنانترولین-۵-۶-دی‌اون [۲۷] گزارش شده‌اند. با استفاده از نتایج این پژوهش‌ها برای این لیگاندهای کی‌لیت شونده هتروآروماتیک، ساختارهای فضایی متنوعی نظیر شبه مسطح مربعی، هرم تتراگونالی منحرف و شبه چهاروجهی می‌توان انتظار داشت.



شکل ۱: نمای کلی واکنش‌های تهیه لیگاندها و کمپلکس نقره (I)



شکل ۲: (الف) ساختار بلوری گزارش شده لیگاند L_1 [۲۳] و (ب) ساختار بلوری لیگاند L_2 [۲۴]

طیف زیرقرمز (IR) - بررسی طیف زیر قرمز (FT-IR) کمپلکس‌های معدنی نشان می‌دهد که ارتعاشات در هر کمپلکس کاملاً مشابه با لیگاندهای آن است و تنها تفاوت در جابه‌جایی فرکانس‌ها می‌باشد. عموماً تغییرات کم یا زیاد در طیف لیگاند شاهدهی بر کوئوردینه شدن لیگاند به فلز مرکزی است و در برخی از موارد می‌توان این تغییرات را به واسطه ساختار فضایی کمپلکس توجیه کرد، یا آن‌را به تغییرات پیوندها درون لیگاند نسبت داد [۲۸]. احتمال دارد که کوئوردیناسیون به فلز مرکزی توسط اتم‌های نیتروژن لیگاند σ -دهنده باعث کاهش دانسیته الکترونی روی حلقه‌های لیگاند شود که در نتیجه آن فرکانس جذبی پیوند $C=N$ کاهش یابد. مواردی هم گزارش شده است که در آن‌ها کوئوردینه شدن فلز به لیگاند سبب جابه‌جایی به فرکانس‌های بالاتر شده است [۲۹]. به طور کلی هرگونه جابه‌جایی در عدد موجی ارتعاشات نشان‌دهنده امکان کوئوردیناسیون می‌باشد که معمولاً این تغییرات برای پیوندهای متصل به اتم دهنده بیشتر می‌باشند. می‌توان میزان جابه‌جایی فرکانس به‌خاطر کوئوردیناسیون را به قدرت پذیرنده هم مرتبط دانست [۲۹].

طیف زیر قرمز لیگاند آزاد L_1 ، L_2 و کمپلکس به صورت قرص KBr در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ گرفته شده است. در بررسی طیف زیرقرمز لیگاند L_1 یک پیک تیز پرشدت در 1716 cm^{-1} وجود دارد، وجود پیک در محدوده طول موجی $1710-1720 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود گروه عاملی $C=O$ می‌باشد. این پیک در طیف زیر قرمز لیگاند L_2 ، حذف می‌گردد و پیک جدیدی در 1657 cm^{-1} مربوط به تشکیل پیوند $C=N$ (حاصل از واکنش تراکم آنیلین با لیگاند دافون) ظاهر می‌شود که نشان‌دهنده تشکیل شیف‌باز است، زیرا محدوده $1640-1690 \text{ cm}^{-1}$ معمولاً حاوی ارتعاش‌های کششی پیوند $C=N$ می‌باشد. بررسی طیف لیگاندهای آزاد L_1 و L_2 و کمپلکس نشان می‌دهد، که ارتعاشات کششی مربوط به هر دو لیگاند در طیف کمپلکس قابل مشاهده است و با کوئوردینه شدن جابه‌جایی در برخی فرکانس‌های ارتعاشی دیده می‌شود. برای مثال باند ارتعاشی کششی پیوند $C=N$ مربوط به بخش آنیلینی لیگاند L_2 از 1657 cm^{-1} برای لیگاند آزاد به 1651 cm^{-1} برای لیگاند کوئوردینه شده تغییر یافته‌است. ارتعاش پیوند $C=O$ که در لیگاند L_1 در 1716 cm^{-1} ظاهر می‌شد نیز در کمپلکس نهایی وجود دارد و به عدد موجی 1722 cm^{-1} منتقل گردیده است. این تغییرات نشان از کوئوردینه شدن هر دو لیگاند به مرکز فلزی نقره (I)

می‌باشد. علاوه بر این، یک نوار جدید در 1332 cm^{-1} ظاهر می‌شود که مربوط به ارتعاش گروه نیترا کونور دینه نشده است [۳۰]. در کمپلکس نوارهای $\nu(\text{C}=\text{N})$ ، $\nu(\text{C}=\text{C})$ حلقه پیریدینی در ناحیه $1590-1410 \text{ cm}^{-1}$ قرار گرفته اند.

بررسی طیف رزونانس مغناطیسی هسته ($^1\text{H NMR}$) - طیف $^1\text{H NMR}$ لیگاند L_1 در حلال دی‌متیل سولفو کساید دوتره در دمای اتاق ۶ پروتون آروماتیک را در $(\text{H}_3$ و $\text{H}_4)$ ، $(\text{H}_1$ و $\text{H}_6)$ ، $(\text{H}_2$ و $\text{H}_5)$ و $(\text{H}_7$ و $\text{H}_8)$ نشان می‌دهد و طیف $^1\text{H NMR}$ لیگاند L_2 در همان حلال و شرایط یکسان نشان‌دهنده پروتون‌های آروماتیک در (H_3) ، (H_4) ، (H_5) ، (H_6) ، (H_7) و (H_8) را در (H_1) و (H_2) ، (H_9) ، (H_{10}) و (H_{11}) ، (H_{12}) ، (H_{13}) و (H_{14}) نشان می‌دهد. برای درک بهتر جابه‌جایی‌های شیمیایی مربوط به پروتون‌ها در لیگاند L_2 ذکر این مطلب ضروری است که به دلیل هیبریداسیون sp^2 اتم نیتروژن در بخش آنیلینی لیگاند، دو حلقه پیریدینی در لیگاند یکسان نیستند. احتمالاً تفاوت در مقادیر جابه‌جایی‌های شیمیایی مربوط به برهم‌کنش پروتون‌ها با جفت الکترون آزاد روی نیتروژن بخش آنیلینی می‌باشد. پروتون‌های نزدیکتر به جفت الکترون آزاد به سمت میدان‌های بالا و برعکس پروتون‌های دورتر به سمت میدان‌های پایین جابه‌جا می‌شوند [۲۲]. این پدیده تفاوت بزرگ جابه‌جایی‌های شیمیایی پروتون ۱ و ۶ را توجیه می‌کند. این اثر با دور شدن از مرکز اثر جفت الکترون آزاد روی نیتروژن) کاهش می‌یابد. همچنین جابه‌جایی‌ها مشابه جابه‌جایی‌های شیمیایی در ترکیب [۱۰]-پاراسیکلوفان^۱ می‌باشند که این ترکیب تحت تاثیر اثر جریان حلقه دارای جابه‌جایی شیمیایی خاصی در پروتون‌های خود می‌باشد.

تفسیر طیف‌های $^1\text{H NMR}$ کمپلکس‌های فلزی دارای لیگاندهای هتروسیکل پیچیده کمی مشکل است. آنچه مسلم است این است که فرایند کمپلکس شدن میان لیگاند و فلز مرکزی منجر به تغییر در جابه‌جایی شیمیایی در طیف لیگاند می‌گردد. به‌خاطر اثر σ حاصل از پیوند لیگاند با فلز، دانسیته الکترونی حلقه‌های آروماتیک لیگاند کاهش می‌یابد و متعاقباً در همه موقعیت‌های حلقه جابه‌جایی به سمت میدان‌های پایین مشاهده می‌شود. مقدار این جابه‌جایی با فاصله پروتون مربوطه از مرکز فلزی نسبت عکس دارد. از طرفی پیوند π برگشتی از اوربیتال‌های d فلز به سیستم π لیگاند باعث افزایش دانسیته π روی کربن‌های حلقه می‌گردد که این عمل باعث تغییر جابه‌جایی شیمیایی پروتون‌های حلقه به سمت میدان بالا می‌گردد. در نقاط دور نسبت به مرکز کونور دیناسیون اثر σ کاهش می‌یابد، بنابراین برای فلزاتی که π برگشتی بزرگی دارند انتظار می‌رود که جابه‌جایی به سمت میدان بالا یا به عبارتی پوشیدگی اتفاق بیافتد [۳۱]. طیف $^1\text{H NMR}$ کمپلکس نقره (I) در حلال و شرایط یکسان با لیگاندها ثبت شده است و نشان‌دهنده پروتون‌های آروماتیک در $(\text{H}_3$ و $\text{H}_6)$ ، (H_1) ، (H_2) و (H_5) ، (H_7) و (H_8) ، (H_9) ، (H_{10}) و (H_{11}) ، (H_{12}) و (H_{13}) ، (H_{14}) و (H_{15}) را در (H_{16}) و (H_{17}) ، (H_{18}) و (H_{19}) ، (H_{20}) و (H_{21}) نشان می‌دهد.

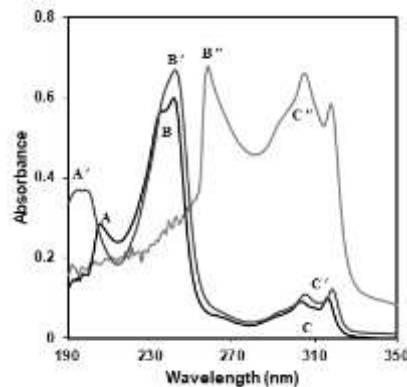
¹ [10]-paracyclophane

(H_{11} و H_{10} و H_{18} و H_{17} ، m) $7/15$ می‌باشد. در مورد این کمپلکس پروتون‌ها نسبت به لیگاند آزاد به سمت میدان پایین جابه‌جا شده‌اند که با عدم تشکیل پیوند π برگشتی در کمپلکس‌های حاوی یون نقره (I) مطابقت دارد.

هدایت مولی - مقدار هدایت مولی $61/5 \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید در دمای اتاق برای این کمپلکس حاکی از آن است که در شرایط گفته شده این کمپلکس الکترولیت ۱:۱ می‌باشد. لازم به ذکر است که براساس مراجع برای الکترولیت‌های ۱:۱ در DMSO، بازه تغییرات هدایت مولی $50-70 \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ می‌باشد [۳۲].

طیف جذبی UV-Vis - لیگاندهای L_1 و L_2 از خانواده فنانترویلین‌ها محسوب می‌شوند و دارای انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ و $n \rightarrow \pi^*$ نزدیک به هم می‌باشند، این لیگاندها به‌خاطر سطح انرژی پایین اوربیتال ضدپیوندی π^* ، پذیرنده الکترونی خوبی هستند و با کاهش کاتیون‌های فلزی باعث انتقال بار فلز به لیگاند می‌شوند. البته در مقابل فلزاتی مثل $Zn(II)$ و $Ag(I)$ که دارای آرایش الکترونی لایه‌بسته d^{10} هستند و به سختی اکسایش می‌یابند، معمولاً انتقالات مرکز لیگانندی^۱ غالب هستند و طیف جذبی کمپلکس‌های حاصل مربوط به بخش لیگانندی می‌باشد که نسبت به لیگاند آزاد کمی دچار تغییر شده است [۳۳، ۳۴]. معمولاً در حلال‌های با قطبیت متفاوت تغییر در شکل، شدت و موقعیت نوارهای جذبی کمپلکس حل‌شده مشاهده می‌گردد. این جابه‌جایی طیفی مربوط به برهم‌کنش‌های حل‌شونده-حلال و حل‌شونده-حل‌شونده به شکل پیوند هیدروژنی یا خواص توده حلال می‌باشد. عوامل موثر دیگر بر طیف جذبی شیمی اسید-باز و برهم‌کنش‌های انتقال بار می‌باشد. قطبیت حلال عامل اصلی موثر بر طول موج جذبی ماکزیمم می‌باشد. انرژی حالت پایه و/یا برانگیخته حل‌شونده ممکن است تغییر کرده و طول موج ماکزیمم را تغییر دهد. بنابراین تغییر قطبیت حلال اطلاعات خوبی از نوع انتقال الکترونی در اختیار می‌گذارد. طیف UV-Vis کمپلکس در حلال‌های آب، متانول و دی‌متیل‌سولفوکساید (10^{-5} M) در محدوده $190-350 \text{ nm}$ گرفته شد و در شکل ۳ نشان داده شده است. طیف جذبی این کمپلکس در حلال‌های مختلف سه سری نوار جذبی را نشان می‌دهد. به علت آرایش الکترونی d^{10} هیچ انتقال الکترونی d-d دیده نمی‌شود. جذب‌های قوی ناحیه UV (سری A و B) به انتقالات درون لیگانندی ($\pi \rightarrow \pi^*$) و ($n \rightarrow \pi^*$) لیگاندها نسبت داده می‌شوند و نوار جذبی در انرژی‌های پایین (دسته C) احتمالاً مربوط به انتقالات $d\pi \rightarrow \pi^*$ (انتقال بار فلز به لیگاند) می‌باشند [۳۵]. تغییر حلال از متانول تا DMSO باعث جابه‌جایی متفاوت در نوارهای جذبی می‌گردد.

¹ Ligand-centered



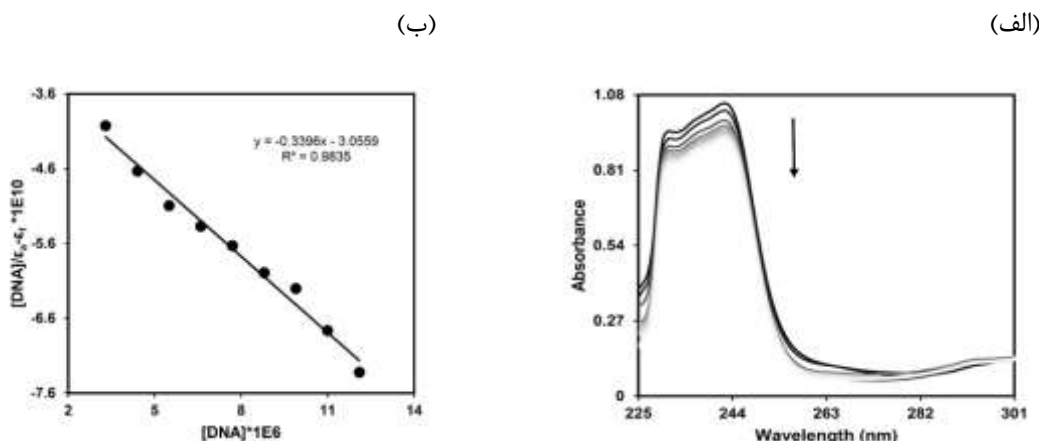
شکل ۳: طیف جذبی (UV-Vis) کمپلکس در حلال‌های آب، متانول و دی‌متیل سولفوکساید با غلظت $10^{-4} M$ در دمای اتاق

۳-۲- برهم‌کنش کمپلکس با DNA

۳-۲-۱- بررسی برهم‌کنش کمپلکس با DNA به وسیله طیف‌سنجی جذبی UV-Vis و محاسبه ثابت پیوند (K_b)

تیتراسیون محلول کمپلکس توسط DNA و اندازه‌گیری میزان جذب محلول در هر مرحله، به علت سادگی و حساسیت و تطابق خوب، روش مناسبی برای بررسی برهم‌کنش میان DNA و کمپلکس فلزی می‌باشد. از آنجایی که خود DNA در منطقه UV دارای جذب می‌باشد، جهت حذف این جذب در اندازه‌گیری جذب کمپلکس برهم‌کنش کننده با DNA از روش استفاده از محلول شاهد و دستگاه طیف‌سنج دوپرتوی استفاده شده است. در اثر برهم‌کنش کمپلکس فلزی با DNA، آشفته‌گی‌های الکترونی در انتقالات طیفی لیگاند در کمپلکس اتفاق می‌افتد [۳۶]. معمولاً در محدوده‌ای خاص از غلظت DNA، حداکثر برهم‌کنش بین DNA و کمپلکس مشاهده می‌شود که با کاهش بیشتر جذب محلول‌ها قابل رویت است. کاهش جذب با افزایش غلظت DNA را اثر هایپوکرومیسم می‌نامند. درصد هایپوکرومیسم مقدار عددی این کاهش را برای مقایسه کمی بین ترکیبات نشان می‌دهد. نتایج مربوط به کمپلکس در شکل ۴ (الف) آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اضافه کردن DNA به محلول این کمپلکس باعث ایجاد تغییر ارتفاع قله‌های باند جذبی مشاهده شده در ۲۴۲ و ۲۳۱ نانومتر به ترتیب ۱۱/۸۲ و ۱۱/۲۰ درصد می‌گردد. مقدار هایپوکرومیسم به‌طور مستقیم با قدرت برهم‌کنش (در اینجا اینترکیلیت شدن) مرتبط است [۳۷]. برای این کمپلکس دو مقدار هایپوکرومیسم متفاوت برای هر نوار جذبی احتمالاً نشان‌دهنده تفاوت قدرت برهم‌کنش هریک از لیگاندهای کوئوردینه شده با DNA می‌باشد. جهت بررسی کمی میزان برهم‌کنش DNA با کمپلکس، با استفاده از معادله ولف-شایمر (۲) و رسم نمودار تغییرات $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ بر حسب $[DNA]$ و محاسبه شیب و عرض از مبدأ می‌توان ثابت پیوند را به دست آورد [۲۰]. این نمودار در دمای ۲۹۸ کلین و طول موج ۲۴۲ نانومتر در شکل ۴ (ب) نشان داده شده است. مقدار ثابت پیوند برهم‌کنش DNA با کمپلکس $1/11 \times 10^5 M^{-1}$ به دست آمده است. این مقدار کمتر از اینترکیلیت‌دهنده‌های کلاسیک مانند اتیدیوم برماید ($K_b = 1/4 \times 10^6 M^{-1}$) [۳۸] می‌باشد اما در مقایسه با کمپلکس‌های مشهور اینترکیلیت‌دهنده‌ای

که قبلا گزارش شده‌اند ($M^{-1} = 1/2 \times 10^5 - 2/9 \times 10^4$) ($K_b = 2/9 \times 10^4$ ، 39 ، 40)، مقدار قابل قبولی دارد که نشان می‌دهد احتمالا این کمپلکس یک اینترکیلیت‌دهنده متوسط است.

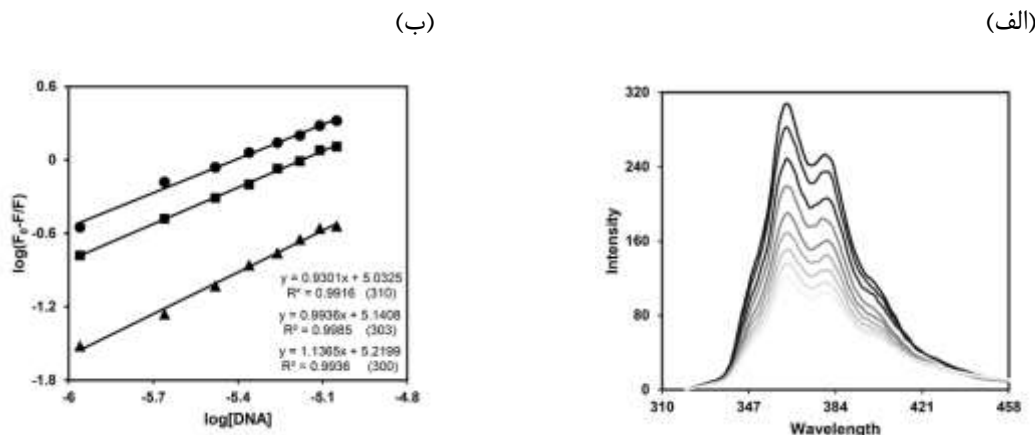


شکل ۴: (الف) تغییرات جذب UV-Vis کمپلکس با افزایش DNA در دمای اتاق؛ (ب) نمودار تغییرات $[DNA]_0/(\epsilon_a - \epsilon_x)$ بر حسب $[DNA]_0$ در nm و 242 و 262 دمای اتاق

۳-۲-۲- بررسی برهم کنش کمپلکس با DNA به روش فلوریمتری در دماهای مختلف

اندازه‌گیری میزان فلوروسانس محلول‌ها در حضور مقادیر افزایش‌دهنده‌ای از DNA، روش مناسب، جامع و اختصاصی تری برای مطالعه نوع برهم کنش کمپلکس‌های فلزی با DNA می‌باشد. این روش ۱۰۰۰ برابر حساس‌تر از اندازه‌گیری‌های جذبی است، بنابراین نتایج حاصل از آن هم مورد اعتمادتر می‌باشد. از آن‌جا که محلول کمپلکس نقره (I) سنتز شده چه به تنهایی و چه در حضور DNA نشر دارد، این بررسی به راحتی با تعیین طیف نشری ترکیب قابل انجام است. آن‌چه در مورد لیگاندهای این کمپلکس (خانواده فنانترولین) ثابت شده این است که نشر عموماً ناشی از انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ می‌باشد، زیرا این لیگاندها حالت‌های یکتایی برانگیخته نزدیک به هم $\pi \rightarrow \pi^*$ و $\pi \rightarrow \pi^*$ دارند. نشر حالت‌های برانگیخته $\pi \rightarrow \pi^*$ هم در مسیرهای غیرتابشی از بین می‌روند و با بهره کوانتومی نشری خیلی پایینی مشخص می‌شوند. به همین دلیل موثرترین ترفند برای بهبود بهره نشری این لیگاندها، افزایش اختلاف انرژی میان انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ و $\pi \rightarrow \pi^*$ با وارد کردن استخلاف‌های مناسب روی حلقه فنانترولین می‌باشد. خواص فتوفیزیکی این لیگاندها با کمپلکس شدن تغییر می‌کنند و اغلب ویژگی‌های لومینسانسی جذابی نشان می‌دهند. اما همانطور که گفته شد در ترکیب با فلزاتی مثل $Ag(I)$ ، طیف جذبی و نشری معمولاً مربوط به قسمت لیگاندی می‌باشد که کمی نسبت به لیگاند آزاد دچار تغییر شده است [۳۴]. طیف نشری کمپلکس در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید-آب ($M = 10^{-3}$) در ناحیه $300 - 600 nm$ گرفته شده است. با بررسی این طیف نشری در طول موج برانگیختگی $280 nm$ (λ_{ex})، این کمپلکس نشری با دو قله در طول موج‌های $362 nm$ و $379 nm$ (λ_{em}) نشان می‌دهد (شکل ۵ الف)). به طور کلی نشر به دلیل آسایش ارتعاشی ناشی از برخورد مولکول‌ها، در طول موج بالاتری (انرژی کمتر) نسبت به جذب رخ می‌دهد، پس نشر ایجاد شده در این طول موج‌ها مربوط به انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ لیگاندها می‌باشد و از آن‌جا که دو لیگاند متفاوت اما از یک خانواده در ساختار

کمپلکس وجود دارند، دو نشر نزدیک به هم با اختلاف ۱۷ nm مشاهده می‌گردد که مربوط به انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ لیگاندهای L_1 و L_2 می‌باشند.



شکل ۵: (الف) نمودار تغییرات میزان نشر کمپلکس با افزایش DNA در دمای ۳۰۰ کلوین؛ (ب) نمودار تغییرات $\log(F_0-F)/F$ بر حسب $\log[DNA]$ کمپلکس (۲) در دماهای ۳۰۰ (مثلث)، ۳۰۳ (مربع)، ۳۱۰ (دایره) بر حسب کلوین

تغییرات میزان نشر محلول کمپلکس با افزایش غلظت‌های افزاینده‌ای از DNA در شکل ۵ (الف) نشان داده شده‌است. در حضور DNA، مقدار نشر محلول کمپلکس کاهش یافته‌است که نشان می‌دهد DNA با اتصال به کمپلکس به عنوان خاموش کننده عمل می‌کند، که این می‌تواند به علت برهم‌کنش بین کروموفور آروماتیک لیگاند و جفت بازهای DNA باشد. بررسی کمی این تغییرات با استفاده از معادله ۳ و رسم نمودار تغییرات $\log(F_0-F)/F$ بر حسب $\log[Q]=\log[DNA]$ امکان‌پذیر است. با محاسبه شیب و عرض از مبدأ این نمودار خطی می‌توان ثابت پیوند را به دست آورد [۲۱]. این نمودار در سه دمای ۳۰۳، ۳۰۰ و ۳۱۰ کلوین در شکل ۵ (ب) نشان داده شده‌است. مقادیر ثابت پیوند برای برهم‌کنش DNA با کمپلکس در سه دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به ترتیب $1/66 \times 10^5$ ، $1/38 \times 10^5$ و $1/08 \times 10^5$ (M^{-1}) به دست آمده‌است. مقدار K_b برای ماده اولیه نقره نیترات ($AgNO_3$) $0/01 \times 10^5 M^{-1}$ می‌باشد [۳۸]. با توجه به اعداد به دست آمده برای ثابت تعادل پیوند DNA با کمپلکس از نقره نیترات بزرگتر می‌باشند، از این رو مشخص می‌شود که کوئوردیناسیون نقره (I) به لیگاند L_1 و L_2 تمایل این فلز را برای برهم‌کنش با DNA افزایش داده‌است. مقدار کمیت K_b برای کمپلکسی مشابه که در آن ۱۰،۱-فنانترولین به جای ۵،۴-دی‌آزافلورن-۹-اون قرار دارد مقدار عددی نسبتاً مشابهی را نشان می‌دهد ($1/70 \times 10^5 M^{-1}$) و در مواردی کمیت‌های بیوشیمیایی برای کمپلکس حاوی فنانترولین تا اندازه‌ای بهتر می‌باشند [۴۱]، که می‌توان آن را به سیستم π وسیع تر لیگاند فنانترولین نسبت داد که قرار است در برهم‌کنش π - π استکی با بازهای DNA شرکت کند.

۳-۲-۳- بررسی ترمودینامیکی برهم‌کنش کمپلکس با DNA

یکی از روش‌های قدرتمند در بررسی دقیق اتصال کمپلکس‌های فلزی با DNA، محاسبه انرژی آزاد برهم‌کنش (ΔG°) می‌باشد. برای بدست آوردن این کمیت، می‌توان اجزاء تشکیل دهنده آن یعنی انتالپی (ΔH°) و انتروپی (ΔS°) را تعیین نمود.

بررسی ترمودینامیک تشکیل کمپلکس زمانی که سایر مطالعات ساختاری نتوانند نیروی پیش‌برنده تشکیل را تعیین کنند، مفید می‌باشد. مطالعه ترمودینامیکی، روش پیوند و نیروهای پیوند یک دارو به مولکول DNA را تعیین می‌کند. انواع برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی سهیم در فرایندهای اتصال بین DNA و کمپلکس‌ها شامل نیروهای واندروالسی، نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی و نیروهای آب‌گریز هستند. با داشتن مقادیر ثابت پیوند DNA با کمپلکس (K_b) در دماهای مختلف و با استفاده از روابط ترمودینامیکی مشهور (۴) و (۵) می‌توان تمام این کمیت‌ها را محاسبه نمود. معادله وانت-هوف (۴) کمک می‌کند تا با رسم نمودار خطی $\ln K_b$ برحسب $1/T$ و بدست آوردن شیب و عرض از مبدا به ترتیب مقادیر عددی ΔH° و ΔS° در دمای موردنظر مشخص شوند. شرط محاسبه انرژی آزاد گیبس (ΔG°) و مقادیر ΔH° و ΔS° با استفاده از این معادلات، این است که دما تغییرات زیادی نداشته باشد و بتوان آن را ثابت فرض کرد [۴۲].

$$\ln K = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad (۴)$$

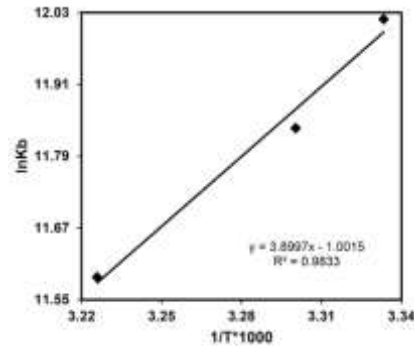
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K_b \quad (۵)$$

در این روابط K_b ، R و T به ترتیب ثابت پیوند، ثابت گازها و دما برحسب کلون هستند. نمودار $\ln K_b$ نسبت به $1/T$ برای کمپلکس در شکل ۶ آمده است و با در نظر گرفتن معادله ۴، دارای شیب $-\Delta H^\circ/RT$ و عرض از مبدا $\Delta S^\circ/R$ می‌باشد. مقادیر انتالپی و انتروپی محاسبه شده برای کمپلکس به ترتیب $-۳۲/۴۲ \text{ kJmol}^{-1}$ و $-۸/۳۳ \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ می‌باشند و ΔG° برای دماهای ۳۰۰، ۳۰۳ و ۳۱۰ کلون به ترتیب $-۲۹/۹۲$ ، $-۲۹/۹۰$ و $-۲۹/۸۴ \text{ kJ mol}^{-1}$ به دست آمده‌اند. با استفاده از علامت و مقدار این پارامترهای ترمودینامیکی می‌توان نوع برهم‌کنش بین کمپلکس فلزی و DNA را تعیین کرد. راس^۱ و سابرامانیان^۲ [۴۳] نشان دادند که یک برهم‌کنش الکترواستاتیک تغییرات انتروپی مثبت و انتالپی کم یا صفر دارد، برهم‌کنش‌های آب‌گریز به همراه تغییرات انتالپی و انتروپی مثبت می‌باشند و پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های وان‌دروالس معمولاً تغییرات انتالپی و انتروپی منفی دارند. اینترکیلیت شدن با کاهش مطلوب انتالپی و کاهش نامطلوب انتروپی همراه است و در عوض برای اتصال شیاری عمدتاً انتروپی نیرومحرکه می‌باشد. با توجه به این حقایق مدل برهم‌کنش قابل پیش‌بینی است. با توجه به داده‌های ترمودینامیکی برای کمپلکس نقره (I) مقادیر منفی انتالپی و انتروپی مشاهده شده است، به عبارت دیگر برهم‌کنش از لحاظ انتالپی مناسب و انتروپی نامناسب است. بنابراین نتایج نشان می‌دهند که پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بر برهم‌کنش دارو با DNA حاکم بوده‌اند و احتمال اتصال با اینترکیلیت شدن بین کمپلکس و DNA بالا می‌رود. مقدار ΔS منفی می‌تواند بیانگر پدیده اینترکیلیت شدن باشد، زیرا این پدیده درجات آزادی چرخشی و انتقالی را محدود می‌کند و یا به عبارتی سیستم منظم‌تر می‌شود. مقادیر منفی بزرگ انرژی آزاد گیبس به معنی خودبه‌خودی بودن این برهم‌کنش می‌باشد. در

¹ Ross

² Subramanian

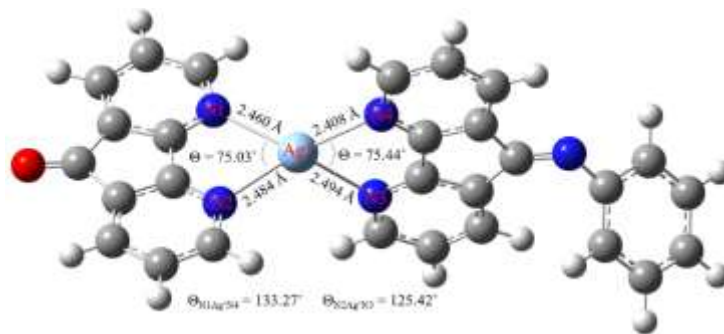
تایید این مطلب، کاهش ثابت پیوند با افزایش دما نشان‌دهنده گرمازا بودن برهم‌کنش است و مقادیر منفی آنتالپی به‌دست آمده هم‌گواه این مطلب است.



شکل ۶: نمودار تغییرات $\ln K_b$ برحسب $1/T$ کمپلکس

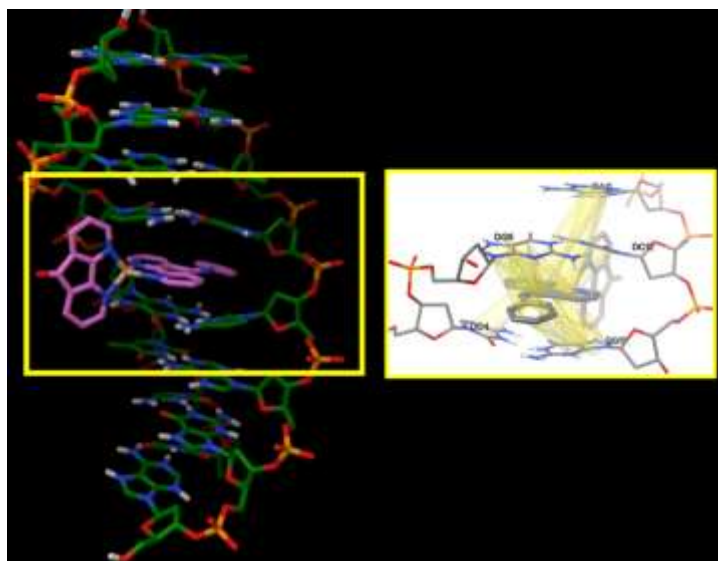
۳-۳- بهینه‌سازی ساختار کمپلکس و بررسی برهم‌کنش با DNA با استفاده از داکینگ مولکولی

به منظور مطالعه نظری برهم‌کنش کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ با DNA ابتدا ساختار مولکول بهینه‌سازی شد. در شکل ۷ ساختار بهینه شده کمپلکس همراه با بعضی از پارامترهای هندسی نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل نیز مشخص است طول پیوندهای Ag^+N1 ، Ag^+N2 ، Ag^+N3 و Ag^+N4 به ترتیب ۲/۴۶۰، ۲/۴۸۴، ۲/۴۹۴، و ۲/۴۰۸ آنگستروم می‌باشند. زوایای $N1-Ag^+-N2$ ، $N3-Ag^+-N4$ ، $N1-Ag^+-N4$ و $N2-Ag^+-N3$ به ترتیب ۷۵/۰۳، ۷۵/۴۴، ۱۳۳/۲۷، و ۱۲۵/۴۲ درجه است که می‌بین این واقعیت است که آرایش هندسی اطراف فلز Ag^+ چهار وجهی است. انرژی برهم‌کنش بین مولکولی ساختار بهینه شده کمپلکس در فاز گازی برابر ۴۷۶/۶۲- کیلو کالری بر مول است.



شکل ۷: ساختار بهینه شده کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$

نتایج داکینگ مولکولی حاکی از آن است که کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ با DNA برهم‌کنشی از نوع اینترکلیت شدن دارد (شکل ۸) و انرژی آزاد اتصال کمپلکس با DNA، $-7/۶۷$ کیلوکالری بر مول است که تطابق قابل قبولی با انرژی و حالت اتصال تجربی دارد. علاوه بر این با توجه به این شکل حالت نسبتاً مسطح لیگاند L_2 شرایط مناسبی برای برقراری برهم‌کنش قوی π - π استکی ایجاد کرده‌است که این برهم‌کنش‌ها بین جفت بازهای DG13، DC4، DC1، و DC5 و کمپلکس می‌باشند.



شکل ۸: برهم‌کنش‌های سه‌بعدی لیگاندهای پذیرنده در کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ با DNA به‌دست‌آمده از نتایج داکینگ مولکولی

۴- نتیجه‌گیری

کمپلکس جدید نقره (I) با لیگاندهای برپایه دی‌آزافلورن طراحی، تهیه و شناسایی شد. تمایل به اتصال کمپلکس به CT-DNA با تکنیک‌های طیف‌سنجی جذبی و فلوریمتری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اینترکیلیت‌شدن این کمپلکس با استکینگ بخش نسبتاً مسطحی از آن میان بازهای DNA انجام می‌گیرد، همچنین انتقال بار از لیگاندهای کوئوردینه‌شده باعث کاهش در دانسیته الکترونی حلقه‌های مزدوج مسطح این لیگاندها می‌شود که نتیجه این امر، جای‌گیری آن‌ها میان بازهای DNA دو رشته‌ای می‌باشد. البته ممانعت فضایی گروه فنیل روی لیگاند L_2 و ساختار فضایی کمپلکس مانع از جای‌گیری کامل مولکول میان بازهای DNA می‌شود و باعث اینترکیلیت‌شدن متوسط این کمپلکس می‌گردد. مطالعات ترمودینامیکی برهم‌کنش، نشان‌دهنده مقادیر منفی انتالپی و انتروپی بود که مشخص می‌کند پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بر برهم‌کنش کمپلکس با DNA حاکم بوده‌اند و مقادیر منفی بزرگ انرژی آزاد گیبس مؤید خودبه‌خودی بودن این برهم‌کنش می‌باشد. در این پژوهش، محاسبه‌های مربوط به بهینه‌سازی ساختاری کمپلکس در سطح نظری B3LYP/6-31+G(d)/LanL2DZ و در چارچوب نظریه تابعی چگالی انجام شده است. تجزیه و تحلیل فرکانس‌های ارتعاشی با روش محاسباتی مشابهی انجام شد که هیچ‌گونه فرکانس موهومی برای کمپلکس نشان نداد. نتایج داکینگ مولکولی تایید کننده این نکته است که کمپلکس $[Ag(L_1)(L_2)]NO_3$ به شیوه اینترکیلیت‌شدن با DNA برهم‌کنش می‌نماید. انرژی آزاد اتصال نظری ۷/۶۷- کیلوکالری بر مول است که توافق خوبی با انرژی آزاد اتصال تجربی ۷/۱۵- کیلوکالری بر مول دارد؛ تطابق نتایج نظری و تجربی نشان‌دهنده صحت نتایج بدست‌آمده است.

۵- مراجع

- [1] S. Tabassum, W.M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmand and V. Bagchi. *Dalton Trans.* **41** (2012) 4955.
- [2] D.E. Thurston, *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*, CRC press (2006).
- [3] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato and C. Marzano. *Chem. Rev.* **114** (2013) 81.
- [4] N. Muhammad and Z. Guo. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19** (2014) 144.
- [5] B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright and J.R. Aldrich-Wright. *Dalton Trans.* **44** (2015) 3505.
- [6] M. Asadi, E. Safaei, B. Ranjbar and L. Hasani. *New J. Chem.* **28** (2004) 1227.
- [7] H. Zhang, C.-S. Liu, X.-H. Bu and M. Yang. *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1119.
- [8] R.V. Gessner, G.J. Quigley, A.H. Wang, G.A. Van der Marel, J.H. Van Boom and A. Rich. *Biochemistry* **24** (1985)237.
- [9] K. Jennette, S. Lippard, G. Vassiliades and W. Bauer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71** (1974) 3839.
- [10] A. Wang, J. Nathans, G. Van der Marel, J. Van Boom and A. Rich. *Nature* **276** (1978) 471.
- [11] A. C. Komor and J. K. Barton, *Chem. commun.* **49** (2013) 3617.
- [12] S. Y. Ebrahimipour, I. Sheikshoae, J. Castro, M. Dušek, Z. Tohidyan, V. Eigner and M. Khaleghi, *RSC Adv.* **5** (2015) 95104.
- [13] A. Pyle, J. Rehmman, R. Meshoyrer, C. Kumar, N. Turro and J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 3051.
- [14] E. Peña-Cabrera, P.-O. Norrby, M. Sjögren, A. Vitagliano, V. De Felice, J. Oslob, S. Ishii, D. O'Neill, B. Åkermark and P. Helquist. *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 4299.
- [15] L. J. Henderson Jr, F. R. Fronczek and W. R. Cherry. *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 5876.
- [16] Y. Wang and D. P. Rillema. *Tetrahedron* **53** (1997) 12377.
- [17] M. Reichmann, S. Rice, C. Thomas and P. Doty. *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 3047.
- [18] J. Marmur, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 208.
- [19] M. Frisch, G. Trucks, H. B. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb ,J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci and G. Petersson. *Inc., Wallingford, CT.* **200** (2009) 28.
- [20] A. Wolfe, G. H. Shimer Jr and T. Meehan. *Biochemistry* **26** (1987) 6392.
- [21] M. Amiri, M. Fazli, D. Ajloo and G. Grivani, *J. Of Applied Chemistry* **14** (1398) 75 in Persian.
- [22] Y. Wang and D. P. Rillema. *Tetrahedron* **53** (1997) 12377.
- [23] K. Ravikumar and N. V. Lakshmi. *Z. Kristallog.* **209** (1994) 56.
- [24] H. Cang, D. Jin, S.-Q. Wang, S. Liu and J.-T. Wang. *Acta. Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online.* **64** (2008) o1221.
- [25] A. J. Pallenberg, T. M. Marschner and D. M. Barnhart, *Polyhedron* **16** (1997) 2711.
- [26] A. M. Alshima'a, Y. M. Gohar, V. Langer, P. Lincoln, F. R. Svensson, J. Jänis, S. T. Gårdebjer, M. Haukka, F. Jonsson and E. Aneheim. *New J. chem.* **35** (2011) 640.

- [27] M. McCann, B. Coyle, S. McKay, P. McCormack, K. Kavanagh, M. Devereux, V. McKee, P. Kinsella, R. O'connor and M. Clynes. *Biometals* **17** (2004) 635.
- [28] A. A. Schilt and R. Taylor. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **9** (1959) 211.
- [29] S. Singh. *Z. Naturforsch. A.* **24** (1969) 2015.
- [30] N. Shahabadi, S. Kashanian and Z. Ahmadipour. *DNA Cell Biol.* **30** (2011)187.
- [31] C. R. Johnson, W. W. Henderson and R. E. Shepherd. *Inorg. Chem.* **23** (1984) 2754.
- [32] W. J. Geary. *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971) 81.
- [33] C. J. Hensler, Ph. D. thesis, An ultraviolet absorption and fluorescence study of 1, 10-phenanthroline and related compounds in aqueous solution (1970).
- [34] G. Accorsi, A. Listorti, K. Yoosaf and N. Armaroli. *Chem. Soc. Rev.* **3** (2009)1690.
- [35] Y. Wang, W. J. Perez, G. Y. Zheng, D. P. Rillema and C. L. Huber. *Inorg. chem.* **37** (1998) 2227.
- [36] P. Kumar, A. K. Singh, J. K. Saxena and D. S. Pandey. *J. Organomet. Chem.* **694** (2009) 3570.
- [37] J. K. Barton, A. Danishefsky and J. Goldberg. *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 2172.
- [38] V. T. Yilmaz, E. Gocmen, C. Icel, M. Cengiz, S. Y. Susluer and O. Buyukgungor. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19** (2014) 29.
- [39] A. Tarushi, G. Psomas, C. P. Raptopoulou and D. P. Kessissoglou. *Polyhedron* **28** (2009) 3272.
- [40] S. Mukherjee, C. Basu, S. Chowdhury, A. P. Chattopadhyay, A. Ghorai, U. Ghosh and H. Stoeckli-Evans. *Inorganica Chim. Acta* **363** (2010) 2752.
- [41] E. Movahedi and A.R. Rezvani. **1160** (2018) 117.
- [42] E. Schütz and N. von Ahsen. *Anal. Biochem.* **385** (2009) 143.
- [43] P. D. Ross and S. Subramanian. *Biochemistry* **20** (1981) 3096.