

# یک کمپلکس Zn(II) با لیگاند باز شیف درشت حلقه تترآزول. تهیه، شناسایی و مطالعه‌های تجربی و نظری برهمکنش آن با CT-DNA و BSA

خاطره عبدی، علیرضا نوروزی، حسن منصورى ترشیزی\*، راضیه ملک محمدی

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

**چکیده:** یک کمپلکس Zn(II) با یک لیگاند باز شیف درشت حلقه که دارای چهار اتم نیتروژن دهنده است از واکنش بین اورتو-فنیلین دی‌آمین، استیل استن و ZnCl<sub>2</sub> با نسبت استوکیومتری ۱:۲:۱ تهیه شد. این واکنش به روش تمپل تک‌ظرف انجام شد. این کمپلکس به روش‌های هدایت‌سنجی، آنالیز عنصری، دمای تجزیه و روش‌های طیف‌سنجی FT-IR، <sup>1</sup>H NMR و UV-Vis شناسایی شد. برهمکنش بین کمپلکس تهیه شده (بیس (استیل استن-اورتو-فنیلین دی‌آمین) روی (II) کلرید) با دی‌اکسی‌ریبونوکلئیک اسید استخراج شده از غده تیموس گوساله (CT-DNA) و آلبومین سرم گاوی (BSA) به کمک طیف‌سنجی جذب الکترونی فرابنفش-مرئی بررسی شد. مقدار ثابت اتصال کمپلکس با CT-DNA بیش‌تر از BSA می‌باشد. غلظت کمپلکس Zn(II) در نقطه میانی انتقال CT-DNA از حالت طبیعی به حالت برهمکنش شده کمتر از BSA است. همچنین ثابت هیل (h) که مقدار آن ۱/۱ به دست آمد نشان‌دهنده غیرتعاونی بودن برهمکنش بین کمپلکس با BSA است. افزون بر این، به منظور بررسی برهمکنش کمپلکس Zn(II) با DNA و BSA، از روش داکینگ مولکولی به کمک ساختار مینیمایز شده کمپلکس استفاده شد.

**واژگان کلیدی:** لیگاند باز شیف، کمپلکس Zn(II)، برهمکنش با DNA، برهمکنش با BSA، داکینگ مولکولی، انرژی اتصال.

**KEYWORDS:** Schiff base ligand, Zn(II) complex, DNA interaction, BSA interaction, Molecular docking, Binding energy.

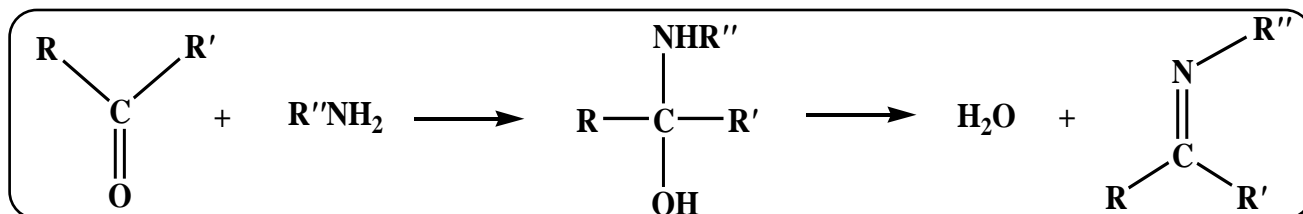
## مقدمه

داده‌اند، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۴-۲]. دلیل این توجه، ویژگی‌های کاربردی آن‌ها می‌باشد. برخی از این کاربردهای مهم عبارتند از: کاتالیست‌های همگن و ناهمگن [۵]، پیش‌ماده الکتروکاتالیستی [۶، ۷]، حسگر [۸]، ضدسرطان، ضدقارچ، ضدباکتری، ضدویروس، ضدپارازیت [۹، ۱۰]، مواد نوری، مواد لومینسانس

بازهای شیف ترکیب‌هایی هستند که دارای گروه آزومتین (-C=N-) بوده و از واکنش تراکمی بین گروه کربونیل آلدهید یا کتون با آمین نوع اول (مطابق شکل ۱) به دست می‌آیند [۱]. در سال‌های اخیر، بازهای شیف که از طریق نیتروژن ایمینی به یون‌های فلزی کوئوردینه شده و کمپلکس‌های پایدار تشکیل

\*Email: hmtorshizi@hamoon.usb.ac.ir

\* عهده‌دار مکاتبات



شکل ۱ - واکنش کلی تهیه بازهای شیف

که ما را به سازوکار برهمکنش دارو-DNA رهنمون می‌سازد [۲۱]. برهمکنش کمپلکس‌های بر پایه فلز با آلومین سرم، از دیرباز مورد توجه دانشمندان بوده است. زیرا این بررسی‌ها می‌تواند به درک موارد مهمی مانند جذب و انتقال مواد غذایی، انتقال دارو، ذخیره مواد، متابولیسم و دفع مواد در مهره‌داران کمک نماید [۲۲]. آلومین سرم در سامانه گردش خون به مقدار فراوان وجود دارد که بیش‌تر مواد غذایی، هورمون‌ها و داروها به کمک آن‌ها جابجا می‌شوند [۲۳]. از بین آلومین‌های موجود در سامانه‌های گردش خون مهره‌داران، آلومین سرم گاوی (BSA)<sup>۲</sup> به فراوانی در مطالعه‌های زیست‌فیزیکی و زیست‌شیمی استفاده شده است. زیرا نه تنها شباهت ساختاری آن با آلومین سرم انسانی (HSA)<sup>۳</sup> زیاد است بلکه ارزان، در دسترس و مطالعه برهمکنش آن با مولکول‌های کوچک به روش‌های طیف‌سنجی امکان‌پذیر می‌باشد. BSA دارای سه واحد<sup>۴</sup> I، II و III است که هر واحد از دو زیرواحد<sup>۵</sup> A و B تشکیل شده‌اند. این مولکول در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای نوار جذبی پرشدت و شاخصی بوده و از نظر فلوروسانس نیز به‌طور ذاتی فعال است. این فعالیت به دلیل دارا بودن تربیتوفان ۱۳۴ (در سطح زیرواحد IB) و تربیتوفان ۲۱۲ (در عمق زیرواحد IIA و در لفاف آبگریز) می‌باشد [۲۴]. تفاوت کلی BSA و HSA، در فاصله زیرواحدهای IIA و IIB این دو پروتئین است. دومین تفاوت در محل تربیتوفان‌هاست [۲۵].

با توجه به نکته‌های اشاره شده، در این پژوهش کمپلکس  $[\text{Znbis}(\text{acac}-o\text{-phdnH})]\text{Cl}_2$  که در آن  $\text{acac}-o\text{-phdnH}$  لیگاند باز شیف به دست آمده از تراکم فنیلن‌دی‌آمین و استیل‌استن است، تهیه و شناسایی شد (شکل ۲ A). برهمکنش این کمپلکس با DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA)<sup>۶</sup> و آلومین سرم گاوی (BSA) به کمک فناوری UV-Vis بررسی شد. مطالعه نظری بر روی کمپلکس سنتز شده به‌منظور شناخت بیشتر ساختار آن انجام پذیرفت. شبیه‌سازی داکینگ مولکولی برای پیش‌بینی جایگاه(های)

که عملکرد آن‌ها شبیه جایگاه فعال آنزیم‌ها می‌باشد [۲]. نقش حیاتی عنصر روی (Zn) در بسیاری از فرایندهای زیستی بر کسی پوشیده نیست. این عنصر در حالت اکسایش +۲، دارای آرایش الکترونی  $d^{10}$  بوده و در سامانه‌های زیستی نیز در همین حالت اکسایش وجود دارد. یون  $\text{Zn}^{2+}$  به‌طور کلی به‌همراه پروتئین‌ها بوده و در شکل آنزیم نقش‌های برجسته‌ای مانند اسید لوئیس، القای هسته‌دوستی در مواد مجاور و پایداری گروه‌های ترک‌کننده در واکنش‌های زیستی را بازی می‌نماید [۱۱، ۱۲]. تعدادی از کمپلکس‌های باز شیف  $\text{Zn}^{2+}$  با ویژگی‌های ضدباکتری، ضدسرطان و مهار کننده رشد تومورها در منابع گزارش شده‌اند [۱۳، ۱۴]. روشن است که اگر بررسی ویژگی‌های زیستی ترکیبی موردنظر باشد، مطالعه برهمکنش آن با ماکرومولکول‌هایی مانند DNA به عنوان هدف و آلومین به عنوان حامل نیاز است [۲].

یکی از هدف‌های مهم برخی داروها و به ویژه داروهای بر پایه عناصر واسطه، DNA است [۱۵-۱۸]. برهمکنش ترکیب‌های ضدسرطان، ضدمالاریا، ضد میکروب و غیره با DNA از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا شناسایی نوع پیوند بین دارو با DNA کمک شایانی به درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها می‌نماید. به‌عنوان نمونه اگر برهمکنش دارو با DNA منجر به جلوگیری از همانندسازی DNA شود، تکثیر سلول مهار می‌شود [۱۹]. بنابراین، مطالعه برهمکنش کمپلکس‌های فلزی با DNA از نقطه نظرهایی مانند دفاع در مقابل بیماری‌ها، طراحی داروهای جدید و کاربرد بالینی آن‌ها بسیار با ارزش است [۲۰]. در این نوع مطالعه‌ها، از یک طرف توانایی پیوند شدن کمپلکس فلزی و از سوی دیگر وجود گروه‌ها یا جایگاه‌های مناسب روی DNA برای برهمکنش با یک‌دیگر دارای اهمیت هستند. برهمکنش کمپلکس‌های فلزی با DNA به‌طور کلی از روش پیوندهای غیر کووالانسی مانند یونی، شیاری و میان‌روی (اینترکلیشن)<sup>۱</sup> انجام می‌پذیرد. هدف از مطالعه این برهمکنش‌ها، اثبات نوع پیوند بوده

(۱) Intercalation

(۳) Human serum albumin

(۵) Sub-domain

(۲) Bovine serum albumin

(۴) Domain

(۶) Calf thymus deoxyribonucleic acid

روی (II) کلرید در ۲۰ میلی لیتر اتانول مطلق حل شد. سپس محلول دارای لیگاند بالا به آرامی به محلول دارای نمک فلز افزوده شد. در این مرحله محلول بنفش رنگی به دست آمد. محلول به دست آمده به مدت دو ساعت در دمای جوش تحت بازروانی قرار گرفت. پس از تغلیظ تا حجم ۱۵ میلی لیتر، مقدار ۴۰ میلی لیتر نرمال هگزان افزوده و هم زده شد تا رسوب بنفش رنگ که فرآورده است، تشکیل شود. مخلوط واکنش به مدت ۱۲ ساعت در یخچال نگهداری شد تا رسوب دهی کامل شود. رسوب های به دست آمده صاف شد و در ۲۰ میلی لیتر مخلوط ۱:۱ از حلال های متانول و استونیتریل حل و سپس صاف شد. مادر آب به مدت ۵ روز تحت نفوذ دی اتیل اتر قرار گرفت که منجر به تشکیل ریزبلورهای بنفش رنگی شد. بلورهای به دست آمده در آن با دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد. وزن فرآورده ۰/۶۷ گرم و راندمان سنتز ۵۶/۲۰ درصد است.

#### روش انجام آزمایش های برهمکنش کمپلکس [Znbis(acac-o-phdnH)]Cl<sub>2</sub> با BSA و CT-DNA

در این آزمایش محلول مادر (استوک) <sup>۱</sup>CT-DNA و BSA به ترتیب با غلظت ۲/۴ و ۵ mg/mL در بافر کار دارای ۵ میلی مولار تریس و ۵ میلی مولار سدیم کلرید با pH = ۷ تهیه شد. همچنین غلظت محلول استوک کمپلکس ۱۰<sup>-۴</sup> مولار می باشد که در آب دوبار تقطیر حل شد.

#### برهمکنش با CT-DNA

برای بررسی برهمکنش کمپلکس سنتز شده با DNA به کمک طیفسنجی UV-Vis، دو آزمایش زیر انجام شد. الف) آزمایش اول: در داخل هر یک از سل های UV-Vis، مقدار ۲ میلی لیتر از بافر کار ریخته و میزان جذب دستگاه صفر شد. سپس از سل نمونه مقدار ۲۵ میکرولیتر از بافر کار برداشته شد و به جای آن ۲۵ میکرولیتر از محلول استوک DNA افزوده گردید تا نه تنها حجم محلول در سل نمونه تغییر نکند، بلکه مقدار ثابتی DNA به بافر اضافه شود که می توان آن را با کمپلکس سنتز شده تیترا کرد. محلول به آرامی هم زده شد تا یکنواخت شود و طیف آن در بازه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک کمپلکس را به هر یک از دو سل نمونه و مرجع افزوده و به آرامی هم زده شد و به مدت

فعال بر روی DNA و BSA به منظور تعیین شیوهی اتصال کمپلکس انجام شد. در این پژوهش، مطالعه های تجربی و نظری در کنار هم تصویری دقیق تر از چگونگی برهمکنش کمپلکس باز شیف با DNA و BSA و همین طور الگویی مولکولی از میزان تفاوت این برهمکنش ها ارائه می دهد.

#### بخش تجربی

##### مواد و دستگاه ها

واکنش گره های مورد استفاده در این پژوهش، شامل اورتوفیلین دی آمین، استیل استن و روی (II) کلرید از شرکت مرک<sup>۱</sup>، DNA غده تیموس گوساله با درجه پلیمریزاسیون بالا نوع ۲<sup>۱</sup>، تریس بافر<sup>۳</sup> و BSA از شرکت سیگما<sup>۴</sup> خریداری شدند. همچنین حلال های اتانول مطلق، متانول، استونیتریل، DMF<sup>۵</sup>، DMSO<sup>۵</sup>، نرمال هگزان و دی اتیل اتر برای خالص سازی از شرکت مرک تهیه شدند. طیف IR کمپلکس سنتز شده به صورت قرص KBr در بازه ۴۰۰-۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> به کمک دستگاه FT-IR، شرکت PerkinElmer، مدل Spectrum TWOFT-IR و طیف های جذب الکترونی به وسیله دستگاه UV-Vis، شرکت Rayleigh مدل UV-1601 ثبت شدند. دمای تجزیه<sup>۶</sup> کمپلکس به وسیله دستگاه الکتروترمال ۹۱۰۰ اندازه گیری شد. طیف <sup>1</sup>H NMR کمپلکس مورد مطالعه، به کمک دستگاه FT-NMR، شرکت Bruker، ۳۰۰ مگاهرتز، مدل Ac-Bruker موجود در پژوهشکده بوعلی آزمایشگاه جامع تحقیقات مشهد در بازه ۰-۱۳ ppm با استاندارد درونی تترا متیل سیلان (TMS) ثبت شد. هدایت الکتریکی مولی کمپلکس سنتز شده به کمک دستگاه هدایت سنج WTW F200 در محیط آبی با استفاده از آب دوبار تقطیر اندازه گیری شد.

#### روش سنتز کمپلکس [Znbis(acac-o-phdnH)]Cl<sub>2</sub>

مقدار ۰/۵۴ گرم (معادل ۵ میلی مول) از اورتوفیلین دی آمین در ۶۰ میلی لیتر اتانول مطلق حل شد. سپس مقدار ۱/۱ میلی لیتر (معادل ۱۰ میلی مول) استیل استن به آرامی به آن افزوده شد. واکنش دهنده ها در دمای جوش به مدت یک ساعت تحت بازروانی قرار گرفت. محلول قهوه ای روشن به دست آمد که به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. در ظرف جداگانه ای مقدار ۰/۶۸ گرم (معادل ۵ میلی مول)

(۱) Merck chemical company

(۳) Tris buffer

(۵) Dimethylformamide

(۷) Decomposition temperature

(۲) Highly polymerized calf thymus DNA type-1

(۴) Sigma chemical company

(۶) Dimethyl sulfoxide

(۸) Stock

$L_{1/2}$  برای هر کمپلکس و DNA در یک دمای مشخص مقداری ثابت است [۲۸،۲۹].

#### برهمکنش با BSA

برای بررسی برهمکنش کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  با BSA نیز از دو آزمایش بالا استفاده شد. با این تفاوت که کلیه آزمایش‌های تیتراسیون جذبی مربوط به BSA به جای طول موج ۲۶۰ نانومتر که بیشینه جذب DNA است، در طول موج ۲۸۰ نانومتر که بیشینه جذب پروتئین‌هاست، انجام شد.

#### بخش نظری

##### بهینه‌سازی ساختار کمپلکس Zn(II)

ساختارهای اولیه کمپلکس Zn(II) مورد مطالعه، به وسیله نرم افزار Gauss View طراحی شد [۳۰]. بهینه‌سازی ساختار طراحی شده و محاسبه‌های فرکانس به کمک نرم‌افزار گاوسی ۱۶ انجام شد [۳۱]. در مرحله نخست، ساختار اولیه پس از طراحی با استفاده از روش B3LYP و مجموعه پایه aug-ccPVTZ برای اتم Zn و مجموعه پایه 6-311++G(d,p) برای سایر اتم‌ها بهینه‌سازی شد. همچنین، محاسبه‌های فرکانس نیز در سطح‌های گوناگون بر روی ساختار انجام شد. نبود فرکانس موهومی نشان می‌دهد که ساختارهای به دست آمده در حالت پایه خود و کمینه انرژی قرار دارند.

##### شبه‌سازی داکینگ مولکولی

نخست به کمک مطالعه‌های داکینگ، چگونگی برهمکنش کمپلکس Zn(II) با ساختار بهینه شده با DNA مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ساختار سه‌بعدی DNA با کد PDB:1BNA از بانک داده‌های پروتئینی به نشانی <http://www.rcsb.org/> دریافت شد. برای داکینگ از پکیج Glide موجود در بسته نرم‌افزاری شرودینگر ۲۰۱۵ میلادی استفاده شد [۳۲]. در ادامه کلیه مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالوگرافی به کمک ابزار protein preparation wizard در شرودینگر حذف و به ساختار متناسب با  $pH = 7.0 \pm 2.0$  با استفاده از ابزار Epik [۳۳] هیدروژن افزوده شد. در گام بعد، به منظور یافتن بازه نسبی اتصال لیگاند به DNA از اندازه شبکه‌ای استفاده شد که کل ساختار DNA را در بر می‌گرفت. اندازه این شبکه در این داکینگ،  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$  در نظر گرفته شد.

۳ دقیقه در دمای محیط (۳۰۰ کلوین) انکوبه شد تا برهمکنش کمپلکس با DNA به تعادل برسد. سپس طیف جذبی آن ثبت شد. تیتراسیون DNA با کمپلکس تا جایی ادامه داده شد که تغییر جذب در طیف‌ها مشاهده نشود. نتیجه‌های به دست آمده از این آزمایش را با استفاده از معادله (۱) مورد تحلیل قرار داده و پارامتر  $K_{app}$  (ثابت ظاهری پیوند شدن) برای برهمکنش کمپلکس با DNA، محاسبه شد [۲۶،۲۷]. در این معادله  $A_0$  جذب اولیه DNA در ۲۶۰ نانومتر در غیاب کمپلکس فلزی،  $A_{\infty}$  جذب نهایی DNA (یعنی زمانی که همه جایگاه‌های پیوندی در DNA توسط کمپلکس فلزی اشغال شده است یا نقطه پایان تیتراسیون) و  $A$  جذب در غلظت‌های متفاوت کمپلکس فلزی در هر نقطه از تیتراسیون است.

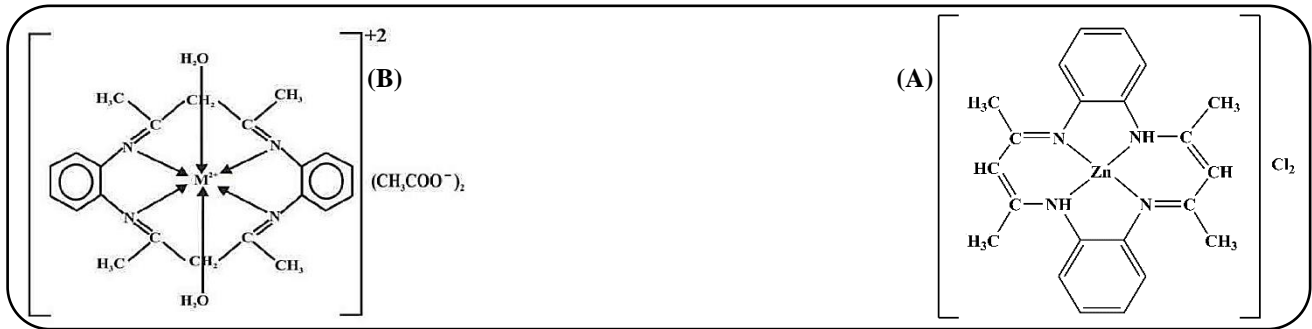
$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_{\infty}-A_0} + \frac{1}{K_{app}(A_{\infty}-A_0)} \times \frac{1}{[complex]} \quad (1)$$

با رسم نمودار  $1/(A-A_0)$  بر حسب  $1/[complex]$  و محاسبه نسبت عرض از مبدأ به شیب، مقدار  $K_{app}$  قابل محاسبه است. (ب) آزمایش دوم: برای بررسی توانایی دناتورکنندگی<sup>۲</sup> (تغییرهای ایجاد شده در ساختار DNA در اثر برهمکنش آن با کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$ ) آزمایش دیگری انجام شد. به این ترتیب که نخست به هر دو سل دستگاه UV-Vis، مقدار  $1/8$  میلی‌لیتر محلول تریس بافر کار افزوده و به کمک آن جذب دستگاه صفر شد. ۲۵ میکرولیتر محلول تریس بافر از سل نمونه برداشته و به همان مقدار محلول استوک DNA اضافه شد تا حجم محلول تغییر نکند. سپس محلول به آرامی هم‌زده شد و جذب آن در ۲۶۰ نانومتر ( $A_{260}$ ) طول موج بیشینه مربوط به DNA) و ۶۴۰ نانومتر ( $A_{640}$ ) طول موج سنجش کدورت) ثبت شد. حال به هر دو سل نمونه و مرجع، ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک کمپلکس افزوده و محتویات سل به آرامی هم‌زده شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای محیط (۳۰۰ کلوین) انکوبه و سپس جذب آن ثبت شد. افزایش محلول کمپلکس و خواندن جذب‌ها تا جایی ادامه پیدا کرد که تغییر در  $A_{260}$  دیده نشود. از رسم مقادیرهای  $(A_{260} - A_{640})$  در برابر  $[L]_t$ ،  $[L]_i$  غلظت کمپلکس پس از هر تزریق است، منحنی سیگموئیدی<sup>۳</sup> را می‌توان دید. از این منحنی می‌توان غلظت کمپلکس در نقطه میانی انتقال، از DNA طبیعی به DNA غیرطبیعی ( $L_{1/2}$ ) را محاسبه کرد. به عبارت دیگر،  $L_{1/2}$  غلظتی از کمپلکس است که باعث تبدیل نیمی از DNA موجود در محیط، از ساختار طبیعی به غیر طبیعی می‌شود.

(۱) Apparent binding constant

(۲) Denaturing

(۳) Sigmoidal curve (S shaped curve)



شکل ۲ - ساختار کمپلکس سنتز شده در این پژوهش (A) و گزارش شده (B) [۳۵]

که در آن  $G_{sol}$  به صورت معادله (۳) تعریف می‌شود:

$$G_{sol} = G_{cav} + G_{vdw} + G_{pol} \quad (3)$$

در این معادله، جمله‌های  $G_{cav}$  و  $G_{vdw}$ ،  $G_{pol}$  به ترتیب مربوط به اثرهای روزنه<sup>۱</sup>، اثرهای واندروالس و اثر قطبش‌پذیری حلال هستند. نتیجه‌های داکینگ به‌دست آمده به منظور وارد کردن اثرهای حلال به نتیجه‌های داکینگ و امتیازدهی دوباره به آن، به‌عنوان ورودی به پکیج MM-GBSA پیاده‌سازی شده در شرودینگر داده شد. از مدل SGB برای الگوسازی اثرهای حلال استفاده شد. ساختار لیگاند صلب در نظر گرفته شده ولی به رزیدوهای DNA و BSA اجازه حرکت داده شد.

### نتیجه‌ها و بحث

یک کمپلکس باز شیف از واکنش تراکمی بین استیل‌استن، اورتو-فنیل‌دی‌آمین و  $ZnCl_2$  بدون آب به ترتیب با نسبت مولی ۱:۱:۲ در حلال اتانول به روش دی‌کومار<sup>۷</sup> و اس‌سینگ<sup>۸</sup> [۳۵] تهیه و تخلیص شد. در این گزارش، نه تنها ویژگی‌های نخستین این کمپلکس (رنگ، دمای تجزیه و حلالیت) با آنچه کومار و اس‌سینگ گزارش کرده بودند، متفاوت بود بلکه به‌کمک  $^1H$  NMR شناسایی نشده بود. در نتیجه شناسایی آن را به روش‌های طیف‌سنجی (FT-IR،  $^1H$  NMR و UV-Vis) و غیرطیف‌سنجی (هدایت مولی، آنالیز عنصری و دمای تجزیه) به‌طور کامل انجام داده و به ساختاری متفاوت (شکل ۲ (A)) با ساختار پیشنهادی کومار (شکل ۲ (B)) پی برده شد. بنابراین در این پژوهش، نخست به شناسایی کمپلکس (A) از شکل ۲ پرداخته شد. سپس اندرکنش تجربی و نظری آن با DNA و BSA ارایه می‌شود:

سپس با استفاده از ابزار Receptor Grid Geration شبکه مورد نیاز برای انجام داکینگ ایجاد و به‌عنوان ورودی در پکیج Glide بارگذاری شد. در طول شبیه‌سازی داکینگ، لیگاند به صورت صلب<sup>۱</sup> در نظر گرفته شد و درستی داکینگ بر روی دقت بالا<sup>۲</sup> تنظیم شد. همچنین به‌کمک داکینگ مولکولی به مطالعه برهمکنش کمپلکس سنتز شده با BSA، پرداخته شد. مطابق با روش بیان شده در مرحله پیش، ساختار سه‌بعدی پروتئین BSA از بانک داده‌های پروتئینی با کد PDB:3V03 دانلود شد. کلیه مولکول‌های آب موجود در ساختار بلوری حذف و به پروتئین در pH مذکور هیدروژن افزوده شد. برای ایجاد شبکه، آمینواسید Trp 213 به عنوان مرکز جعبه انتخاب و اندازه شبکه  $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$  در نظر گرفته شد. سرانجام، داکینگ با تنظیم‌های ذکر شده بالا انجام شد.

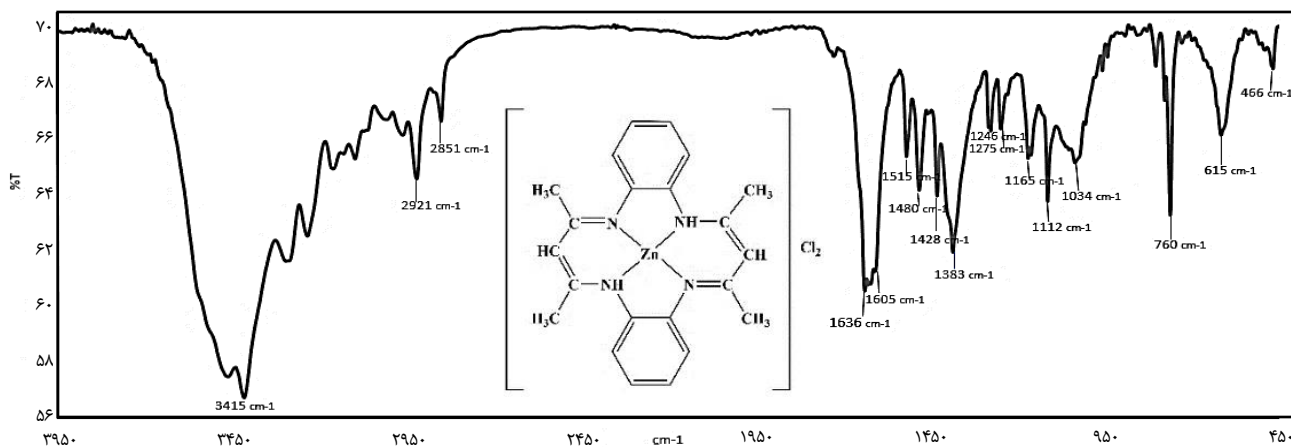
### روش امتیاز دهی مجدد<sup>۳</sup> برای تصحیح نتیجه‌های داکینگ و تعیین انرژی اتصال<sup>۴</sup>

به‌طور معمول در برآورد انرژی آزاد اتصال لیگاندهای کوچک به مولکول‌های زیستی، از روش MM-GBSA استفاده می‌شود. این روش در بسته شرودینگر اجرا شده است [۳۴]. در این روش انرژی آزاد حلال‌پوشی با استفاده از الگوی سطح تعمیم یافته برن (SGB)<sup>۵</sup> محاسبه می‌شود. در این الگو از فرم انرژی تازه‌ای استفاده شده است که بر پایه میدان نیروی OPLS-AA بوده، اثر حلال ( $G_{sol}$ ) و جمله‌هایی برای تصحیح اثرهای فیزیکی به آن افزوده شده است. صورت کلی این الگوی پتانسیل به شکل معادله (۲) است:

$$G_{total} = E_{bonds} + E_{angles} + E_{torsions} + E_{impropers} + E_{electrostatic} + E_{VDW} + G_{sol} + E_{corrections} \quad (2)$$

- (۱) Rigid
- (۳) Rescoring
- (۵) Surface Generalized Born
- (۷) Kumar

- (۲) Extra precision
- (۴) Binding energy
- (۶) Cavity
- (۸) S. Singh



شکل ۳ - طیف FT-IR کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  ثبت شده در قرص KBr

با توجه به این که ترکیب بالا می‌تواند به دلیل فرکانس کششی گروه‌های  $C=C$  حلقه آروماتیک و همچنین  $HC=C$  در بازه ۱۶۳۶ جذب داشته باشد، همان‌گونه که شکل ۳ نشان می‌دهد، علت چندتایی شدن این نوار می‌تواند به علت همپوشانی فرکانس کششی این گروه-های عاملی با فرکانس کششی گروه آزومتین ( $-C=N-$ ) باشد. نوار جذبی ظاهر شده در ناحیه  $3415\text{ cm}^{-1}$  به فرکانس کششی گروه  $NH$  نسبت داده می‌شود [۴۱، ۴۲]. افزون بر این، فرکانس‌های کششی گروه‌های  $C-N$ ،  $C-C$  و  $Zn-N$  به ترتیب در نواحی ۱۴۲۸، ۱۲۴۶ و  $466\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند [۴۳، ۴۴] (شکل ۳ را ببینید).

#### طیف $^1H$ NMR

طیف پروتون NMR کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  در حلال  $DMSO-d_6$  و با استفاده از استاندارد داخلی TMS ثبت و در شکل ۴ نشان داده شده است. در این طیف سیگنال‌های ظاهر شده در ناحیه‌های ۱/۷۹، ۴/۱۶، ۶/۵۵، ۶/۸۹ و ۹/۸۸ ppm به ترتیب به پروتون‌های a، b، c، d و e نسبت داده می‌شوند. سطح زیر سیگنال‌ها با تعداد پروتون‌های نسبت داده شده به هر یک از سیگنال‌ها همخوانی کامل داشته و دارای نسبت ۱:۲:۲:۱ هستند و با ساختار پیشنهادی مطابقت دارد. شایان ذکر است که بازه انتگرال‌گیری در سیگنال ظاهر شده در ناحیه ۹/۸۹ ppm بیش از بازه سطح زیر سیگنال، ثبت شده است. بنابراین مقدار آن قدری بیش‌تر از مقدار مورد انتظار می‌باشد. این یافته طیفی با ساختار پیشنهادی مطابقت دارند.

#### طیف جذب الکترونی مرئی-فرابنفش

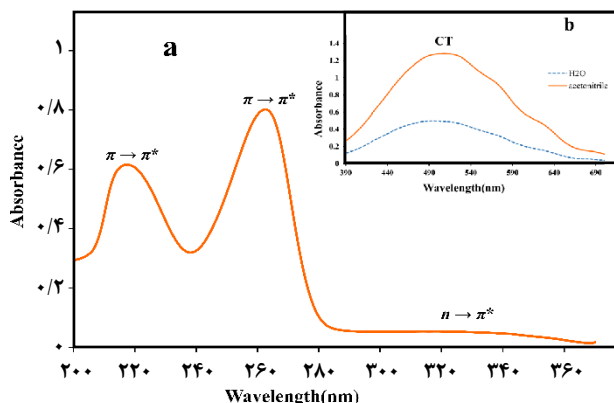
طیف جذب الکترونی کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  با غلظت  $10^{-5}\text{ M}$  در حلال استونیتریل ثبت شد (شکل ۵ (a) را ببینید).

#### توصیف ساختار کمپلکس $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$ به کمک روش‌های طیف‌سنجی و غیر طیف‌سنجی

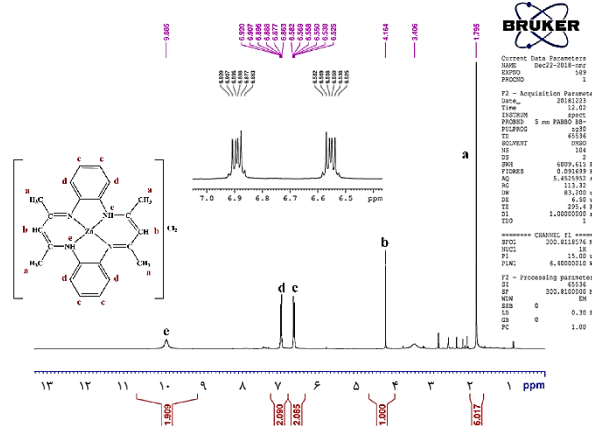
کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  به‌خوبی در آب محلول است. محلول بودن یک ترکیب در آب یکی از ویژگی‌های با اهمیت در استفاده از آن برای سیستم‌های زیستی به عنوان دارو، ضدباکتری، ضدویروس، ضدقارچ و غیره می‌باشد. هدایت الکتریکی این کمپلکس با غلظت  $10^{-3}$  مولار با استفاده از آب دوبار تقطیر اندازه‌گیری شد که مقدار هدایت مولی آن  $274\text{ cm}^2 \cdot \text{Ohm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  به‌دست آمد. این مقدار هدایت الکتریکی به دو نکته اشاره دارد. نخست آن که وجود سه یون (یک یون کمپلکس با دو بار مثبت و دو یون  $Cl^-$ ) در محلول کمپلکس را تأیید می‌کند که با ساختار پیشنهادی نشان داده شده در شکل ۲ (A) مطابقت دارد [۳۶]. دوم اینکه دو یون  $Cl^-$  به صورت یون همراه برای موازنه دو بار مثبت یون کمپلکس بوده و به  $Zn^{2+}$  کوئوردینه نشده‌اند. شایان توجه است چون کمپلکس در اتانول مطلق تهیه شده است، امکان پیوند شدن مولکول‌های آب اندک است. آنالیز عنصری CHN (درصد تجربی:  $C = 54/81$ ،  $H = 4/98$ ،  $N = 11/78$  و درصد نظری:  $C = 54/96$ ،  $H = 5/03$ ،  $N = 11/65$ ) نیز با ساختار پیشنهادی (شکل ۲ (A)) در توافق بوده و نیز دمای تجزیه آن ۲۳۹-۲۴۱ درجه سلسیوس به‌دست آمد.

#### طیف زیرقرمز FT-IR

در طیف FT-IR کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  فرکانس کششی گروه‌های  $C=C$  حلقه آروماتیک،  $C-H$  خمشی متیلن و کششی گروه  $-CH_3$  به ترتیب در نواحی ۱۵۱۶، ۷۶۰ و  $2921\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند [۳۷، ۳۸]. همچنین فرکانس ارتعاشی گروه آزومتین ( $-C=N-$ ) در ناحیه  $1636\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است [۳۹، ۴۰]. شایان ذکر است که



شکل ۵ - a: طیف جذب الکترونی کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  با غلظت  $10^{-3} M$  در حلال‌های استونیتریل (—) و آب (---)؛ b: با غلظت  $10^{-5} M$  در حلال استونیتریل و آب (---) و آب (—)



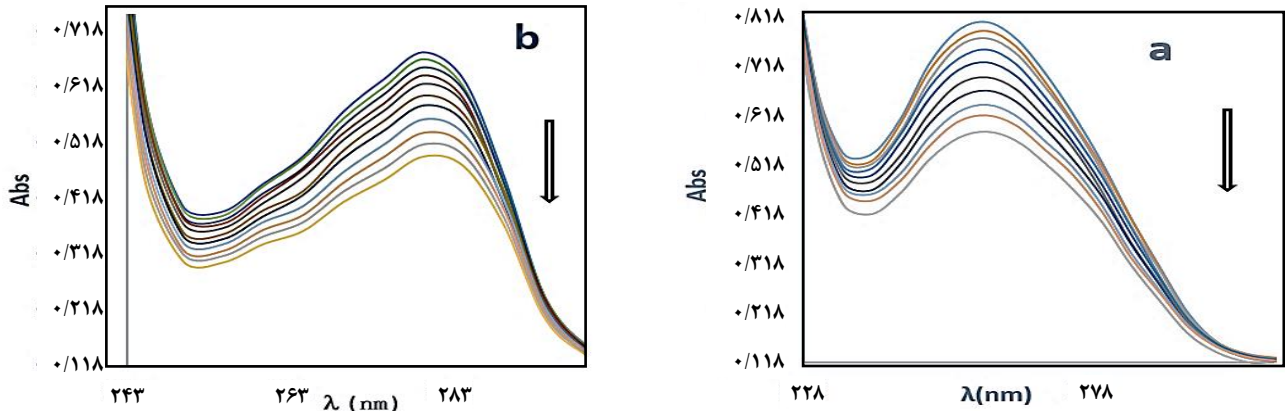
شکل ۴ - طیف  $^1H$  NMR کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  در حلال  $DMSO-d_6$

شده با DNA، تغییرهای کنفورماسیونی DNA به گونه‌ای باشد که این بازهای آلی بیشتر در معرض امواج فرابنفش قرار گیرند، جذب افزایش و اگر کمتر در معرض قرار گیرند (از معرض نور مخفی شوند) جذب کاهش می‌یابد. با افزایش تدریجی کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  با غلظت  $10^{-4}$  مولار به محلول CT-DNA، جذب کاهش یافت (شکل ۶ a). افزایش کمپلکس آن قدر ادامه یافت تا تغییر در جذب مشاهده نشود یعنی کلیه جایگاه‌های واکنش‌پذیر DNA با کمپلکس اشباع شود. از این آزمایش نتیجه می‌گیریم که درگیر شدن کمپلکس با DNA، کنفورماسیون نوین در DNA القا می‌کند که در آن کنفورماسیون DNA دو رشته‌ای که در حالت طبیعی تاخورد است، فشرده‌تر و در نتیجه بازهای آلی کم‌تر در برابر نور فرابنفش قرار گرفته و جذب کاهش می‌یابد [۲۶، ۲۷]. نکته مهم دیگر این است که توانایی کمپلکس برای پیوند شدن به DNA و یا BSA متفاوت است. این توانایی را می‌توان از روی مقدار  $K_{app}$  که از معادله (۱) محاسبه می‌شود تخمین زد. برای کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  مقادیر  $K_{app}$  به ترتیب  $1.63 \times 10^5 M^{-1}$  در برهمکنش با DNA و  $1.15 \times 10^4 M^{-1}$  در برهمکنش با BSA در دمای  $300$  کلوین مطابق شکل ۷ به‌دست آمد. این مقادیر نشان می‌دهد که تمایل برهمکنش کمپلکس سنتز شده با CT-DNA بیش‌تر از BSA است. این نکته یکی از نقطه‌های قوت یک ترکیب ضدسرطان، ضدباکتری، ضدویروس و ضدقارچ است. زیرا ماده‌ای که با DNA سلول برهمکنش مناسبی داشته باشد، نه تنها ممکن است فعالیت آن (به‌ویژه همانندسازی) را مختل کرده و امکان توقف تکثیر آن را فراهم آورد، بلکه منجر به از بین رفتن آن می‌شود. از سوی دیگر، ضعیف بودن برهمکنش یک ترکیب با BSA نیز مثبت

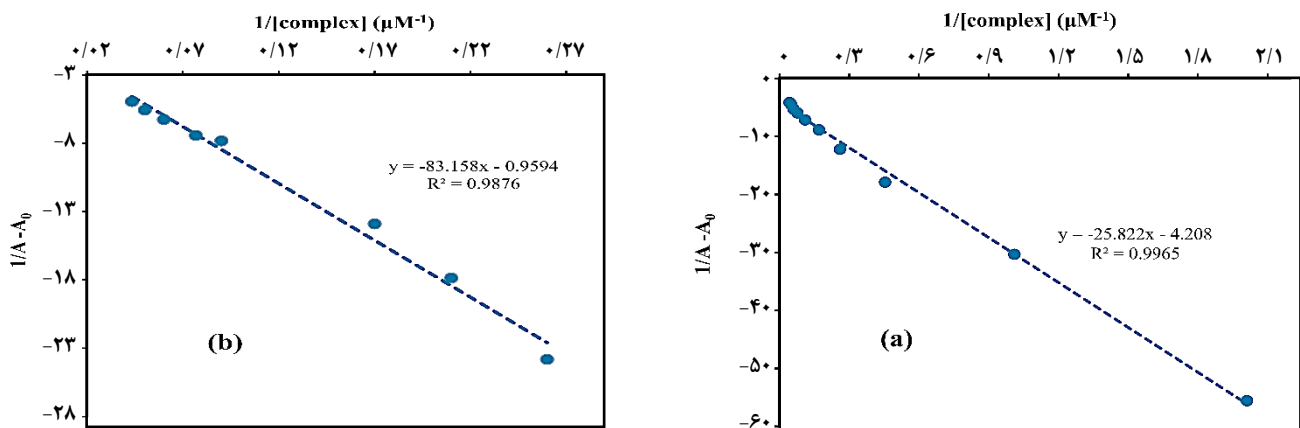
در این طیف، دو نوار جذبی مشاهده شده در ناحیه  $217$  nm (با ضریب جذب مولی  $61552 M^{-1}cm^{-1}$ ) و  $263$  nm (با ضریب جذب مولی  $80105 M^{-1}cm^{-1}$ ) به انتقال‌های درون لیگاندی  $\pi \rightarrow \pi^*$  نسبت داده می‌شوند. همچنین نوار مشاهده شده در ناحیه  $320$  nm (با ضریب جذب مولی  $5400 M^{-1}cm^{-1}$ ) به انتقال  $n \rightarrow \pi^*$  نسبت داده می‌شود. نظر به این که با کوئوردینه شدن نیتروژن‌های درشت حلقه به مرکز Zn، دانسیته الکترونی موجود در اوربیتال مولکولی غیرپیوندی این نیتروژن‌ها کاهش یافته و همان‌گونه‌ای که طیف ۵ (a) نشان می‌دهد این نوار از شدت کم‌تری برخوردار بوده که این کاهش شدت نوع انتقال را پشتیبانی می‌کند. به منظور رویت نوارهای احتمالی ضعیف، طیف کمپلکس بالا با غلظت  $10^{-3} M$  در حلال‌های استونیتریل و آب که دارای قطبیت متفاوتند نیز ثبت شد. در این غلظت، یک نوار پهن در ناحیه  $508$  nm (با ضریب جذب مولی  $1278 M^{-1}cm^{-1}$ ) دیده شد (شکل ۵ b). همان‌گونه که دیده می‌شود، این نوار در حلال آب به ناحیه  $492$  nm (با ضریب جذب مولی  $497 M^{-1}cm^{-1}$ ) جابه‌جا شد. این جابه‌جایی (۱۶ nm) از حلال با قطبیت کم (استونیتریل) به حلال با قطبیت بیشتر (آب) به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (جابه‌جایی آبی) نشان می‌دهد که این نوار به احتمال قوی مربوط به نوار انتقال بار از فلز به لیگاند (MLCT) می‌باشد [۴۵، ۴۶].

#### نتیجه‌های به‌دست آمده از برهمکنش کمپلکس $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$ با DNA و BSA و تعیین ثابت ظاهری پیوند ( $K_{app}$ )

در ناحیه فرابنفش یک نوار پهن ولی پرشدت در  $260$  نانومتر دارد که به دلیل بازهای پورینی و پیریمیدینی این ماکرومولکول است [۲۶، ۲۷]. اگر در اثر برهمکنش کمپلکس سنتز



شکل ۶ - طیف‌های UV-Vis محلول DNA (a) و BSA (b) در حضور غلظت‌های افزایشی از کمپلکس  $[\text{Znbis}(\text{acac}-o\text{-phdnH})]\text{Cl}_2$  در دمای ۳۰۰ کلون



شکل ۷ - نمودار  $1/A-A_0$  بر حسب  $1/[\text{complex}]$  در دمای ۳۰۰ کلون برای محاسبه  $K_{app}$  در برهمکنش کمپلکس  $[\text{Znbis}(\text{acac}-o\text{-phdnH})]\text{Cl}_2$  با DNA (a) و BSA (b)

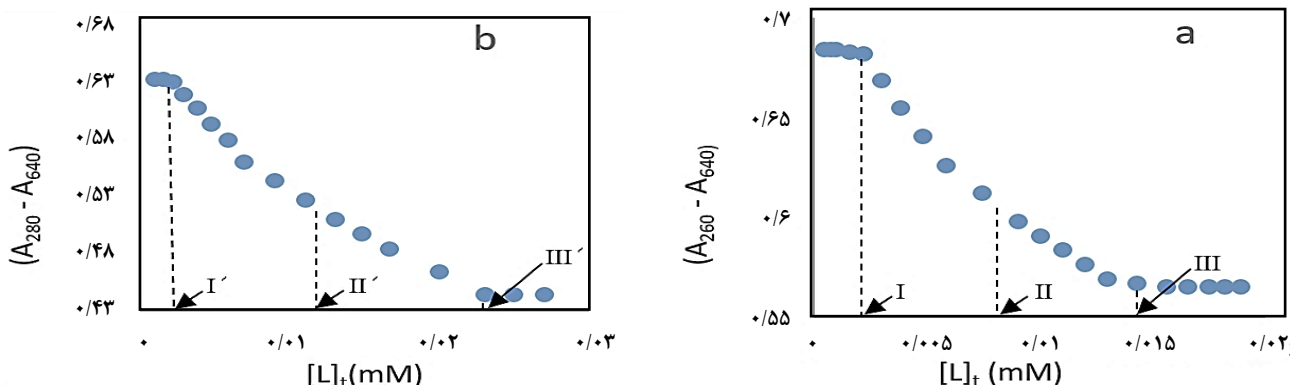
مولکول‌های زیستی آغاز شده و هنگامی که به  $0.0143 \text{ mM}$  (نقطه III) و  $0.023 \text{ mM}$  (نقطه III') می‌رسد، برهمکنش بین آن‌ها تمام شده یا به تعادل رسیده‌اند. روشن است که برهمکنش در سل دارای CT-DNA در نقطه II و برای BSA در نقطه II' به نیمه راه رسیده است. این نقاط را با  $L_{1/2}$  نشان داده که مطابق شکل ۸، برای CT-DNA برابر با  $0.0082 \text{ mM}$  و برای BSA برابر با  $0.0126 \text{ mM}$  به دست آمد. در واقع غلظتی از کمپلکس سنتز شده است که در آن غلظت، ۵۰ درصد از CT-DNA یا BSA موجود در محیط با کمپلکس برهمکنش نموده‌اند. این نقطه برای اندرکنش هر ترکیب با هر درشت مولکول‌های زیستی در شرایط مشخص، مانند یک ثابت فیزیکی محسوب می‌شود. بدیهی است که هر چه مقدار  $L_{1/2}$  یک ترکیب کوچک‌تر باشد، برهمکنش آن با درشت مولکول‌های زیستی بیش‌تر است. از سویی می‌دانیم مواد شیمیایی که به عنوان دارو مصرف می‌شوند (به‌ویژه آن‌هایی که سنتزی هستند)، به درصد‌های

است. زیرا یکی از نقش‌های BSA حمل مواد در سامانه خونی می‌باشد. در فرایند حمل نباید برهمکنش بین ترکیب و پروتئین طوری قوی باشد که ساختار آن را منقلب کرده و یا پر شدن جایگاه‌های BSA و تخلیه آن در هدف به راحتی انجام نپذیرد. مقدارهای  $K_{app}$  به‌دست آمده از مطالعه‌های یادشده با کمپلکس‌های فلزی ضدتومور هم-خانواده هم‌خوانی دارند [۱۳،۴۷].

#### غیرطبیعی شدن CT-DNA و BSA با افزایش غلظت کمپلکس $[\text{Znbis}(\text{acac}-o\text{-phdnH})]\text{Cl}_2$

این تیتراسیون مطابق آزمایش دوم از بخش تجربی انجام شد، سپس منحنی تغییرهای جذب در برابر غلظت کمپلکس سنتز شده در دمای ۳۰۰ کلون مطابق شکل ۸ رسم شد. همان‌گونه که شکل ۸ نشان می‌دهد، هنگامی که غلظت کمپلکس به  $0.022 \text{ mM}$  (نقطه I) در ظرف دارای محلول CT-DNA و  $0.023 \text{ mM}$  (نقطه I') در ظرف دارای محلول BSA می‌رسد، برهمکنش بین کمپلکس و درشت





شکل ۸ - منحنی‌های غیرطبیعی شدن DNA (a) و BSA (b) با افزایش غلظت کمپلکس [Zn(bis(acac-o-phdnH)]Cl<sub>2</sub> در دمای ۳۰۰ کلوین

شده) را محاسبه نمود. با جایگزین کردن  $K_{app}$  در معادله (۵) یا معادله هیل<sup>۴</sup> پارامتر  $h$  (درجه همیاری یا تعاونی<sup>۵</sup>) قابل محاسبه است.

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{K_{app} \times \Delta A_{\infty}} \times \frac{1}{[Complex]} + \frac{1}{\Delta A_{\infty}} \quad (۴)$$

در این معادله  $\Delta A$ ها اختلاف جذب محلول BSA با نخستین، دومین، سومین و ... تزریق از محلول کمپلکس فلزی است. بدیهی است که عبارت  $\Delta A_{\infty}$  عبارت است از اختلاف جذب BSA با جذب آن پس از آخرین تزریق که دیگر جذب‌ها ثابت مانده و واکنش به تعادل رسیده است.

$$\log \left[ \frac{1}{\Delta A_{\infty} - \Delta A} \right] = h \log [Complex] + \log K_{app} \quad (۵)$$

چنانچه مقدار  $h$  حدود ۱ باشد، نشان‌دهنده غیرهمیاری یا غیرمتعاون بودن<sup>۶</sup> یعنی مستقل بودن شیوه برهمکنش است. به عبارت دیگر، برهمکنش یک مولکول از کمپلکس با BSA، باعث تغییر (تمایل کمتر یا بیشتر) در پیوند شدن مولکول‌های کمپلکس با جایگاه‌های مجاور روی BSA نمی‌شود و باز هم به عبارت ساده‌تر، هر مولکول از کمپلکس به صورت مستقل با BSA برهمکنش دارد. ولی اگر مقدار  $h$  بیشتر از ۱ باشد، شیوه پیوند همیاری یا متعاون<sup>۷</sup> و غیرمستقل است. این نوع همیاری دو گونه است:

الف) همیاری مثبت یا تعاونی مثبت<sup>۸</sup>: یعنی پیوند شدن یک مولکول کمپلکس با BSA، کنفورماسیون را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که جایگاه‌های مجاور بر روی پروتئین با آسانی بیشتری با کمپلکس برهمکنش نمایند. ب) همیاری منفی یا تعاونی منفی<sup>۹</sup>: که وارون همیاری مثبت است.

گونگون، عوارض جانبی ایجاد می‌کنند. بدیهی است که اگر مقدار  $L_{1/2}$  دارو کوچک‌تر باشد دوز آن کمتر و انتظار می‌رود عوارض جانبی آن نیز کم‌تر باشد. در نتیجه،  $L_{1/2}$  مربوط به هر ترکیب در بحث دارو و درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مقدارهای  $L_{1/2}$  برای کمپلکس گزارش شده در این پژوهش بسیار کوچک بوده و نوید فعالیت بیش‌تر و عوارض جانبی کم‌تر را می‌دهد [۲۶،۲۷].

#### تعیین پارامتر درجه همیاری<sup>۱</sup> ( $h$ )

مطابق گزارش‌های منتشر شده [۴۸]، تاباندن امواج فرابنفش نزدیک (۴۰۰-۱۹۰ نانومتر) به آلبومین‌ها (BSA، HSA،  $\beta$ -لاکتوگلوبولین و غیره) به‌طور کلی منجر به تغییرهای کنفورماسیونی در ساختار سوم این پروتئین‌ها می‌شود. این گونه تغییرها یا با کاهش جذب (تا خوردن بیشتر پروتئین<sup>۲</sup> نسبت به حالت طبیعی که در نتیجه آن، اسیدهای آمینه جاذب نور در ۲۸۰ nm، یعنی تریپتوفان، فنیل‌آلانین و تیروزین از معرض نور UV مخفی می‌شوند و به دنبال آن جذب کاهش می‌یابد) و یا افزایش جذب نور (تاگشایی<sup>۳</sup> آلبومین که طی آن، اسیدهای آمینه جاذب نور، بیش‌تر در معرض نور UV قرار گرفته و جذب افزایش می‌یابد) همراه است. در فرایند برهمکنش کمپلکس سنتز شده در این پژوهش با BSA و با استفاده از معادله (۴)، نمودار  $1/\Delta A$  بر حسب  $1/[complex]$  رسم و از تقسیم عرض از مبدأ  $(1/\Delta A_{\infty})$  به شیب  $(1/(K_{app} - \Delta A_{\infty}))$  می‌توان  $K_{app}$  (ثابت ظاهری برهمکنش پروتئین با کمپلکس سنتز

(۱) Degree of cooperativity

(۳) Unfolding

(۵) Cooperativity

(۷) Cooperative

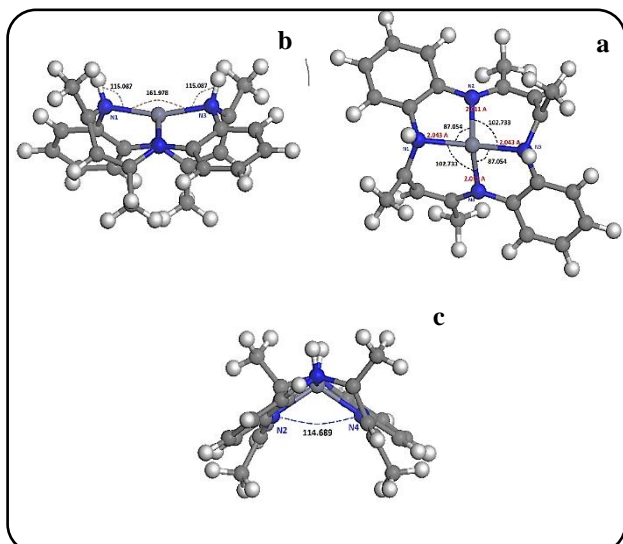
(۹) Negative cooperative

(۲) Refolding

(۴) Hill equation

(۶) Non-cooperative

(۸) Positive cooperative

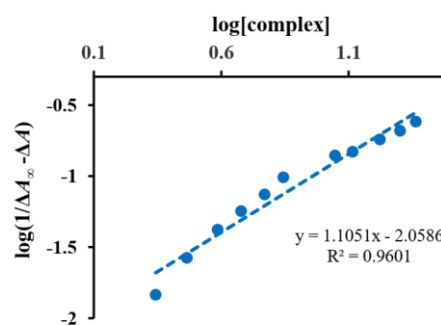


شکل ۱۰ - ساختار بهینه شده کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  (a) نمای از روبه رو، (b) و (c) نمای از کنار

نشان می‌دهند. سطح‌های توزیع بار در تشخیص جایگاه‌های واکنش‌پذیر و همچنین چگونگی برهمکنش مولکول‌ها با یکدیگر کمک زیادی به ما می‌کند. بهترین راه درک و تفهیم اطلاعات به دست آمده از این نقشه‌ها نمایش بصری آن است. در نتیجه برای تحلیل آسان داده‌های انرژی پتانسیل الکترواستاتیکی، یک طیف رنگی از قرمز برای نشان دادن مقادیر منفی پتانسیل الکترواستاتیکی (نشان‌دهنده چگالی الکترونی بیش‌تر) تا رنگ آبی برای نمایش مقادیر مثبت انرژی پتانسیل الکترواستاتیکی (نشان‌دهنده چگالی الکترونی کمتر) به کار گرفته شده است [۴۹]. شکل ۱۱ نقشه پتانسیل الکترواستاتیکی را برای کمپلکس  $Zn(II)$  نشان می‌دهد. رنگ آبی با شدت متفاوت در سرتاسر مولکول نشان‌دهنده پتانسیل الکترواستاتیکی بیشینه است. با توجه به توزیع طیف رنگی، به روشنی دیده می‌شود که هیدروژن‌های متصل به اتم‌های  $N1$  و  $N3$  دارای بیش‌ترین پتانسیل الکترواستاتیکی یعنی کم‌ترین چگالی الکترونی در مولکول می‌باشند. این بدان معناست که این دو اتم هیدروژن تمایل دارند در مجاورت با مولکول‌های دیگر به عنوان پذیرنده الکترون عمل کنند. این مشاهده با یافته‌های  $^1H$  NMR که در آن پوشیده‌ترین پروتون‌های مولکول، پروتون‌های e (شکل ۴ را ببینید) هستند در توافق است.

#### بررسی داکینگ کمپلکس $Zn(II)$ بر روی DNA و BSA

در این مطالعه، داکینگ مولکولی به صورت کلی به بررسی برهمکنش کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  بر روی DNA و BSA از طریق برهمکنش‌های غیر پیوندی (برهمکنش‌های



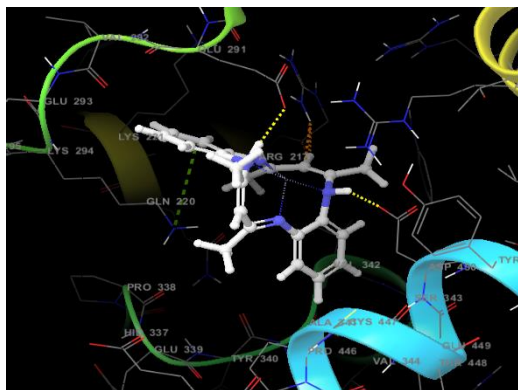
شکل ۹ - نمودار  $\log(1/\Delta A_{\lambda_0} - \Delta A)$  بر حسب  $\log[\text{complex}]$  در دمای  $30^\circ C$  برای محاسبه پارامتر درجه همیاری (h)

مقدار پارامتر  $h$  در برهمکنش کمپلکس  $[Znbis(acac-o-phdnH)]Cl_2$  با BSA مطابق نمودار شکل ۹ معادل  $1/1$  به دست آمد. این مقدار نزدیک به ۱ است و نشان می‌دهد که نوع پیوند کمپلکس با BSA غیرمتعاون و مستقل است. محاسبه‌های نظری نیز این مشاهده را تأیید می‌کند.

#### بهینه‌سازی ساختار کمپلکس با روش DFT

درغیاب داده‌های کریستالوگرافی، از روش‌های مدل‌سازی به-عنوان ابزاری کارآمد برای بررسی و تحلیل ویژگی‌های ساختاری به‌ویژه در زمینه شیمی کوئوردیناسیون استفاده می‌شود. با استفاده از این ابزار می‌توان اطلاعات جامعی از وضعیت الکترونی، واکنش-پذیری و پایداری مواد به دست آورد. از این رو، نماهایی از ساختار بهینه شده با استفاده از روش DFT در شکل ۱۰ آورده شده است. بر طبق نتیجه‌های به دست آمده از روش DFT همان گونه که در شکل ۱۰ (a) نشان داده شده طول پیوند  $Zn-N1$  ( $2/0.43$  آنگستروم) بیشتر از طول پیوند  $Zn-N2$  ( $2/0.11$  آنگستروم) پیش‌بینی شده است. می‌توان تفاوت بین این دو پیوند را در میزان خصلت بیش‌تر اوربیتال s اتم N2 نسبت به اتم N1 دانست. مقدار بیشتر طول پیوند  $Zn-N1$  و در نتیجه کشیدگی بیش‌تر این پیوند باعث افزایش زاویه پیوندی  $N1-Zn-N4$  ( $102/733$  درجه) نیز نسبت به زاویه  $N1-Zn-N2$  ( $87/054$  درجه) شده است. شکل ۱۰ (b) و (c) نماهایی دیگر از ساختار بهینه شده کمپلکس یادشده را نشان می‌دهند که در آن زاویه پیوندی بین اتم‌های  $N1-Zn-N3$  و  $N2-Zn-N4$  به ترتیب برابر با  $161/978$  و  $114/689$  درجه به دست آمده که نتیجه آن ایجاد یک ساختار V شکل برای کمپلکس یادشده است.

نقشه‌های پتانسیل الکترواستاتیکی، نمودارهای سه‌بعدی بسیار مفیدی از مولکول‌ها هستند که توزیع بار سه‌بعدی مولکول را



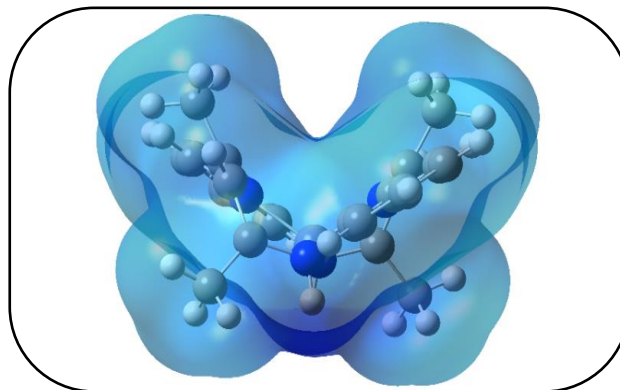
شکل ۱۳ - نمایشی از جایگاه فعال BSA پیش‌بینی شده با استفاده از محاسبه داکینگ. لیگاند Zn(II) با رنگ سفید و پیوندهای هیدروژنی با خط چین زرد نشان داده شده است. خط چین سبز رنگ نمایانگر پیوند  $\pi$ -کاتیون است

که در شیار اصلی<sup>۱</sup> DNA جای‌گیری کند. به نظر می‌رسد نیروهای چیره برای جای‌دهی لیگاند در شیار اصلی اغلب از نوع واندروالسی بوده و هیچ گونه پیوند هیدروژنی بین لیگاند مذکور و رزیدوهای DNA دیده نشد. مقدار انرژی آزاد اتصال به روش MM-GBSA برابر با  $-۳۴/۲۳$  کیلوکالری بر مول به دست آمد.

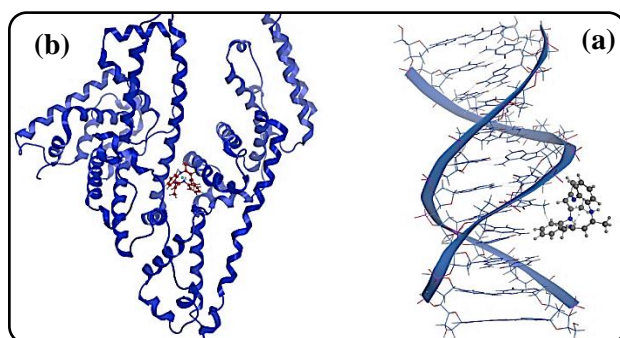
BSA شامل ۵۸۳ اسید آمینه است که در سه واحد (I, II, III) و دو زیر واحد A و B سازمان‌دهی شده‌اند. اصلی‌ترین جایگاه فعال BSA در روزهی آب‌گریز ایجاد شده میان زیر واحد IIA و IIIA قرار گرفته است. شکل ۱۲ (b) بهترین پیکربندی کمپلکس Zn(II) را با BSA نشان می‌دهد. انرژی آزاد اتصال به دست آمده از روش MM-GBSA برای این ترکیب برابر با  $-۴/۵۱$  کیلوکالری بر مول به دست آمد.

چنان چه در شکل ۱۳ نشان داده شده است، در تطابق با پیش‌بینی‌های نقشه الکترواستاتیکی، گروه‌های NH موجود در کمپلکس Zn(II) در ایجاد پیوند هیدروژنی با اسید آمینه‌های Glu291 و Asp450 به صورت پذیرنده عمل می‌کنند. همچنین حلقه‌های موجود در لیگاند مذکور با شاخه جانبی اسید آمینه Gln220 در پیوند  $\pi$ -کاتیون شرکت کرده است.

مقدار انرژی اتصال به دست آمده از نتیجه‌های داکینگ و محاسبه‌های MM-GBSA بر روی DNA و BSA نشان داد که برخلاف BSA، کمپلکس Zn(II) تمایل بسیار بالایی به اتصال به DNA از خود نشان داده که در تطابق با داده‌های تجربی به دست آمده در این پژوهش است.



شکل ۱۱ - نقشه پتانسیل الکترواستاتیکی کمپلکس  $[Zn(bis(acac-o-phdnH))]Cl_2$



شکل ۱۲ - پیکربندی مربوط به بهترین انرژی آزاد تعیین شده به کمک روش MM-GBSA برای اتصال کمپلکس Zn(II) به DNA (a) و BSA (b)

الکترواستاتیک، واندروالس و پیوند هیدروژنی) می‌پردازد. همان گونه که در بخش نظری گفته شد به منظور بازه اتصال کمپلکس به DNA، اندازه شبکه برابر با تمام ساختار در نظر گرفته شد تا برنامه به جستجوی بهترین مکان ممکن برای لیگاند بپردازد. پیکربندی گزارش شده پس از انجام داکینگ، بر اساس تابع امتیازدهی تعریف شده در برنامه Glide مرتب می‌شوند. به دلیل در نظر نگرفتن اثر حلال و همچنین در نظر نگرفتن دینامیک سامانه، نتیجه‌های داکینگ باید با روش‌هایی که از نظر محاسبه‌ای به صرفه باشند و نقص‌های بالا را رفع کنند، امتیازدهی دوباره شود. برای این منظور از پکیج MM-GBSA موجود در شرودینگر برای این کار استفاده شد که در آن اثر حلال به صورت غیرصریح برای امتیازدهی دوباره و تعیین انرژی اتصال کمپلکس به رستپور استفاده شد. شکل ۱۲ (a) بهترین پیکربندی کمپلکس امتیازدهی شده با استفاده از روش MM-GBSA را با DNA نشان می‌دهد. همان گونه که در شکل ۱۲ (a) نشان داده شده است کمپلکس Zn(II) تمایل دارد

(۱) Major groove

## نتیجه‌گیری

در غلظت بسیار پایین با CT-DNA و BSA برهمکنش می‌نماید. نکته جالب توجه این است که برهمکنش این کمپلکس با CT-DNA قوی‌تر از BSA است. این نتیجه می‌تواند نویدبخش ضدسرطان بودن این ترکیب باشد که در کارهای پژوهشی آتی پیگیری خواهد شد. به منظور بررسی برهمکنش کمپلکس سنتز شده با DNA و BSA در مقیاس اتمی، داکینگ مولکولی برای این ترکیب انجام شد. نتیجه‌های داکینگ سپس با استفاده از تکنیک MM-GBSA امتیازدهی دوباره شد تا اثر حلال و دینامیک رسپتور نتیجه‌های دقیق‌تری را از انرژی اتصال کمپلکس ارائه دهد. میزان انرژی‌های اتصال به‌دست آمده نشان داد که تمایل کمپلکس مذکور به DNA بسیار بیش‌تر از BSA بوده که با نتیجه‌های تجربی در توافق است.

## قدردانی

نویسندگان به‌خاطر پشتیبانی مالی، مساعدت و همکاری‌های لازم از دانشگاه سیستان و بلوچستان قدردانی می‌کنند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۹

در این پژوهش از واکنش بین استیل استن و اورتو-فنیلن‌دی‌آمین یک ترکیب باز شیف درشت‌حلقه که دارای دو اتم نیتروژن آزومتین و دو اتم نیتروژن آمیدی است، در حضور  $ZnCl_2$  به‌روش تمپلت تک‌ظرف تهیه شد. این ترکیب کمپلکس به‌روش‌های طیف‌سنجی (FT-IR، UV-Vis،  $^1H$ NMR) و غیرطیف‌سنجی (هدایت مولی، آنالیز عنصری، دمای تجزیه) شناسایی شد. در این ترکیب،  $Zn(II)$  با چهار اتم نیتروژن کوئوردینه شده و کمپلکس به دست آمده به‌خوبی در آب محلول و پایدار است. بنابراین، تلاش شد ویژگی‌های بیولوژیکی آن نیز بررسی شود. این ویژگی‌ها می‌تواند در شکل ضدویروس، ضدقارچ، ضدسرطان، ضدباکتری و غیره بروز نمایند که در تعداد زیادی از آن‌ها، ماده با DNA و یا پروتئین سامانه‌های زیستی درگیر شده و بر عملکرد آن‌ها اثر می‌گذارد. در نتیجه، مطالعه‌های تجربی در برهمکنش بین این کمپلکس با DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA) و پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) انجام شد. نتیجه‌های جالبی که از مطالعه‌های تجربی به‌دست آمد، سبب شد تا مطالعه‌های تئوری اندرکنش بین این کمپلکس درشت‌حلقه با CT-DNA و BSA نیز بررسی شود. در مطالعه‌های تجربی که به روش طیف‌سنجی جذب الکترونی انجام شد، مشخص شد که این ترکیب

## مراجع

- [1] Al Zoubi W., Kandil F., Chebani K., [Active Transport of Metal Ions by using Schiff Bases](#), *Phys. Sci. Res. Int.*, **2(1)**: 12–23 (2014).
- [2] Shahraki S., Heydari A., [New Zinc\(II\) N4 Tetradentate Schiff Base Complex: A Potential Cytotoxic Metallodrug and Simple Precursor for the Preparation of ZnO Nanoparticles](#), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **160**: 564–571 (2017).
- [3] Cozzi P.G., [Metal–Salen Schiff base Complexes in Catalysis: Practical Aspects](#), *Chem. Soc. Rev.*, **33(7)**: 410–421 (2004).
- [4] Gupta K.C., Sutar A.K., Lin C.-C., [Polymer-Supported Schiff base Complexes in Oxidation Reactions](#), *Coord. Chem. Rev.*, **253(13–14)**: 1926–1946 (2009).
- [5] Xia Q.-H., Ge H.-Q., Ye C.-P., Liu Z.-M., Su K.-X., [Advances in Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Asymmetric Epoxidation](#), *Chem. Rev.*, **105(5)**: 1603–1662 (2005).
- [6] Guo P., Wong K.-Y., [Enantioselective Electrocatalytic Epoxidation of Olefins by Chiral Manganese Schiff-Base Complexes](#), *Electrochem. Commun.*, **1(11)**: 559–563 (1999).
- [7] Cheung K.-C., Wong W.-L., Ma D.-L., Lai T.-S., Wong K.-Y., [Transition Metal Complexes as Electrocatalysts—Development and Applications in Electro-Oxidation Reactions](#), *Coord. Chem. Rev.*, **251(17–20)**: 2367–2385 (2007).

- [8] Shamsipur M., Yousefi M., Hosseini M., Ganjali M.R., Sharghi H., Naeimi H., [A Schiff Base Complex of Zn \(II\) as a Neutral Carrier for Highly Selective PVC Membrane Sensors for the Sulfate Ion](#), *Anal. Chem.*, **73(13)**: 2869–2874 (2001).
- [9] Sunatsuki Y., Motoda Y., Matsumoto N., [Copper\(II\) Complexes with Multidentate Schiff-Base Ligands Containing Imidazole Groups: Ligand-Complex or Self-Complementary Molecule?](#), *Coord. Chem. Rev.*, **226(1–2)**: 199–209 (2002).
- [10] Ziessel R., [Schiff-based Bipyridine Ligands. Unusual Coordination Features and Mesomorphic Behaviour](#), *Coord. Chem. Rev.*, **216**: 195–223 (2001).
- [11] Vallee B.L., Auld D.S., [Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and other Proteins](#), *Biochemistry*, **29(24)**: 5647–5659 (1990).
- [12] Voegelin A., Pfister S., Scheinost A.C., Marcus M.A., Kretzschmar R., [Changes in Zinc Speciation in Field Soil after Contamination with Zinc Oxide](#), *Environ. Sci. Technol.*, **39(17)**: 6616–6623 (2005).
- [13] Shahraki S., Majd M.H., Heydari A., [Novel Tetradentate Schiff Base Zinc\(II\) Complex as a Potential Antioxidant and Cancer Chemotherapeutic Agent: Insights from the Photophysical and Computational Approach](#), *J. Mol. Struct.*, **1177**: 536–544 (2019).
- [14] Ghorai P., Saha R., Bhuiya S., Das S., Brandão P., Ghosh D., Bhaumik T., Bandyopadhyay, P., Chattopadhyay, D., Saha, A., [Syntheses of Zn\(II\) and Cu\(II\) Schiff Base Complexes using N, O Donor Schiff Base Ligand: Crystal Structure, DNA Binding, DNA Cleavage, Docking and DFT Study](#), *Polyhedron*, **141**: 153–163 (2018).
- [15] Patra A.K., Roy S., Chakravarty A.R., [Synthesis, Crystal Structures, DNA Binding and Cleavage Activity of L-Glutamine Copper\(II\) Complexes of Heterocyclic Bases](#), *Inorganica Chim. Acta*, **362(5)**: 1591–1599 (2009).
- [16] Haribabu P., Patil Y.P., Reddy K.H., Nethaji M., [DNA-Binding and Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Based Thiocyanato, Acetato, Azido and Benzoato Bridged Dinuclear Copper\(II\) Complexes](#), *Transit. Met. Chem.*, **36(8)**: 867–874 (2011).
- [17] Sava G., Gagliardi R., Bergamo A., Alessio E., Mestroni G., [Treatment of Metastases of Solid Mouse Tumours by NAMI-A: Comparison with Cisplatin, Cyclophosphamide and Dacarbazine](#), *Anticancer Res.*, **19(2A)**: 969–972 (1999).
- [18] Chifotides H.T., Koshlap K.M., Pérez L.M., Dunbar K.R., [Novel Binding Interactions of the DNA Fragment d \(pGpG\) Cross-Linked by the Antitumor Active Compound Tetrakis\(μ-Carboxylato\)Dirhodium\(II, II\)](#), *J. Am. Chem. Soc.*, **125(35)**: 10714–10724 (2003).
- [19] Koiri R.K., Trigun S.K., Dubey S.K., Singh S., Mishra L., [Metal Cu\(II\) and Zn\(II\) Bipyridyls as Inhibitors of Lactate Dehydrogenase](#), *Biometals*, **21(2)**: 117–126 (2008).
- [20] Shokohi-Pour Z., Chiniforoshan H., Momtazi-Borojeni A.A. Notash, B., [A Novel Schiff Base Derived from the Gabapentin Drug and Copper\(II\) Complex: Synthesis, Characterization, Interaction with DNA/Protein and Cytotoxic Activity](#), *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **162**: 34–44 (2016).
- [21] Balakrishnan C., Theetharappan M., Kowsalya P., Natarajan S., Neelakantan M.A., Mariappan S.S., [Biocatalysis, DNA–Protein Interactions, Cytotoxicity and Molecular Docking of Cu\(II\), Ni\(II\), Zn\(II\)](#)

- and V(IV) Schiff Base Complexes, *Appl. Organomet. Chem.*, **31(11)**: e3776 (2017).
- [22] Wang Y.-Q., Zhang H.-M., Zhang G.-C., Studies of the Interaction between Palmatine Hydrochloride and Human Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41(3)**: 1041–1046 (2006).
- [23] Peters Jr.T., "All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications", Academic Press (1997).
- [24] Paul B.K., Samanta A., Guchhait N., Exploring Hydrophobic Subdomain IIA of the Protein Bovine Serum Albumin in the Native, Intermediate, Unfolded, and Refolded States by a Small Fluorescence Molecular Reporter, *J. Phys. Chem. B*, **114(18)**: 6183–6196 (2010).
- [25] Asadi M., Asadi Z., Zarei L., Sadi S.B., Amirghofran Z., Affinity to Bovine Serum Albumin and Anticancer Activity of some New Water-Soluble Metal Schiff Base Complexes, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **133**: 697–706 (2014).
- [26] Heydari A., Mansouri-Torshizi H., Design, Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, Molecular Docking and Analysis of Binding Interactions of Novel Acetylacetonatopalladium(II) Alanine and Valine Complexes with CT-DNA and BSA, *RSC Adv.*, **6(98)**: 96121–96137 (2016).
- [27] Mansouri-Torshizi, H., Zareian-Jahromi, S., Abdi, K., Saeidifar, M., Nonionic but Water Soluble, [Glycine-Pd-Alanine] and [Glycine-Pd-Valine] Complexes. Their Synthesis, Characterization, Antitumor Activities and Rich DNA/HSA Interaction Studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **37(13)**: 3566–3582 (2019).
- [۲۸] اسماعیل زابی ز، صبوری ع.ا، منصورى ترشیزی ح، سعیدی فر م، دیوسالار ع، مطالعه برهمکنش کمپلکس‌های نیکل (II) دارای لیگاندهای آروماتیک مسطح با DNA غده تیموس، تشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، **۳۲(۲)**: ۱ تا ۱۳ (۱۳۹۲).
- [۲۹] منصورى ترشیزی ح، جهانگیری س، بابایی زارچ م، خدابخشی کنگان ز، نرشتی ف، حیدری مجد م، تهیه، شناسایی، ویژگی‌های ضدتومور، برهمکنش با DNA و تاثیر بار الکتریکی موجود روی نسبت‌های مولی گوناگون کمپلکس‌های Zn(II):Pd(II) در ترکیب درمانی " آن‌ها، تشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، **۳۶(۲)**: ۵۵ تا ۶۹ (۱۳۹۶).
- [30] Dennington, Roy, Todd Keith, and John Millam. "Semichem Inc." Shawnee Mission KS, GaussView, Version 5, no. 8 (2009).
- [31] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A. and Nakatsuji, H., 2009. 09, Revision D. 01, Gaussian. Inc., Wallingford, CT.
- [32] Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., Mainz, D.T., Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes, *J. Med. Chem.*, **49(21)**: 6177–6196 (2006).
- [33] Greenwood J.R., Calkins D., Sullivan A.P., Shelley J.C., Towards the Comprehensive, Rapid, and Accurate Prediction of the Favorable Tautomeric States of Drug-Like Molecules in Aqueous Solution, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **24(6–7)**: 591–604 (2010).
- [34] Li J., Abel R., Zhu K., Cao Y., Zhao S., Friesner R.A., The VSGB 2.0 Model: A Next

- Generation Energy Model for High Resolution Protein Structure Modeling, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **79(10)**: 2794–2812 (2011).
- [35] Kumar D., Singh S., [One Pot Template Synthesis, Characterization and Biological Assay of Tetraaza \(N4\) Macrocyclic Complexes of Transition Metal Ions Derived from Acetylacetonone/Succinic Acid with O-Phenylenediamine](#), *J. Chem. Pharm. Res.*, **8(4)**: 744–748 (2016).
- [36] Angelici R.J., "Synthesis and Techniques in Inorganic Chemistry", Saunders, London (1969).
- [37] Singh D.P., Grover V., Kumar K., Jain K., [Metal Ion Prompted Macrocyclic Complexes Derived from Indole-2,3-Dione \(Isatin\) and O-Phenylenediamine with their Spectroscopic and Antibacterial Studies](#), *Acta Chim. Slov.*, **57(4)**: 775–780, 2010.
- [38] Silverstein R.M., Bassler G.C., [Spectrometric Identification of Organic Compounds](#), *J. Chem. Educ.*, **39(11)**: 546 (1962).
- [39] Sharma V.K., Pandey O.P., Sengupta S.K., Halepoto D.M., [Synthesis, Spectroscopic and Thermal Studies on Ruthenium\(III\), Rhodium\(III\) and Iridium\(III\) Complexes with Hydrazones Derived from 2,6-Diacetylpyridine and Different Aromatic Hydrazides](#), *Transit. Met. Chem.*, **14(4)**: 263–266 (1989).
- [40] Sharma Y.R., "Elementary Organic Spectroscopy", S. Chand Publishing (2007).
- [41] Khan T.A., Rather M.A., Jahan N., Varkey S.P., Shakir M., [Tetraoxotetraamide Macrocyclic Complexes](#), *Transit. Met. Chem.*, **23(3)**: 283–285 (1998).
- [42] Singh A.K., Panwar A., Singh R., Baniwal S., [New Bis-Macrocyclic Complexes with Transition Metal Ions](#), *Transit. Met. Chem.*, **28(2)**: 160–162 (2003).
- [43] Nakamoto K., "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", Wiley Online Library (1978).
- [44] Bellamy L., "The Infra-Red Spectra of Complex Molecules", Springer Science & Business Media (2013).
- [45] Anbalagan V., Srivastava T.S., [Spectral and Photophysical Properties of Mono and Dinuclear Pt\(II\) and Pd\(II\) Complexes: An Unusual Emission Behaviour](#), *Polyhedron*, **23(18)**: 3173–3183 (2004).
- [46] Takagi H.D., Noda K., Itoh S., Iwatsuki S., [Piezochromism and Related Phenomena Exhibited by Palladium Complexes](#), *Platin. Met. Rev.*, **48(3)**: 117–124 (2004).
- [47] Asadizadeh S., Amirnasr M., Tirani F.F., Mansouri A., Schenk K., [DNA-BSA Interaction, Cytotoxicity and Molecular Docking of Mononuclear Zinc Complexes with Reductively Cleaved N2S2 Schiff Base Ligands](#), *Inorganica Chim. Acta*, **483**: 310–320 (2018).
- [48] Alam M.M., Abul Qais F., Ahmad I., Alam P., Hasan Khan R., Naseem I., [Multi-Spectroscopic and Molecular Modelling Approach to Investigate the Interaction of Riboflavin with Human Serum Albumin](#), *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36(3)**: 795–809 (2018).
- [49] Murray J.S., Politzer P., "The Electrostatic Potential: An Overview", *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, **1(2)**: 153–163 (2011).