

# مطالعه برهم کنش کمپلکس‌های باز شیف اکسو وانادیم (IV) با DNA تیموس گوساله توسط روش‌های طیف‌سنجی ماورای بنفش - مرئی، طیف‌سنجی فلورسانس و بررسی

## خواص ضدباکتریایی آن‌ها

مجید امیری<sup>۱</sup>، مصطفی فضلی<sup>۱\*</sup>، داود عاجلو<sup>۲</sup>، غلامحسین گریوانی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده شیمی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۲</sup> دانشکده شیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۵

تاریخ تصحیح: ۹۶/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۰۹

### چکیده

در این پژوهش ابتدا برهم‌کنش کمپلکس‌های باز شیف اکسو وانادیم حاصل از مشتقات سالیسیلیدین، با DNA تیموس گوساله (ct-DNA) توسط روش‌های طیف‌سنجی ماورای بنفش - مرئی و فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نتایج حاصل از این مطالعات تجربی، مکانیسم اتصال بین دو مشتق کلرو و مشتق برموز کمپلکس‌های فلزی باز شیف با DNA، ثابت اتصال لیگاند به DNA و تعداد جایگاه اتصال (n) مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر ثابت اتصال ( $k_b$ ) و ( $k_f$ ) به دست آمده به ترتیب از مطالعات طیف‌سنجی ماورای بنفش - مرئی و طیف‌سنجی فلورسانس برای مشتق کلرو بزرگتر از مشتق برموز بوده، که این نشان دهنده وجود برهم‌کنش‌های بیشتر بین کمپلکس کلرو با DNA می‌باشد. سپس اثر ضد میکروبی کمپلکس‌های باز شیف فوق، روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرتوس و باکتری گرم منفی اشرشیاکلی، مورد مطالعه قرار گرفت و با مواد آنتی‌باکتریال استاندارد مقایسه شد. بر اساس نتایج به دست آمده، هر دو کمپلکس باز شیف وانادیل مورد مطالعه دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی بودند، با این تفاوت که مشتق حاوی گروه عاملی کلر فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به مشتق حاوی گروه عاملی برم در برابر باکتری گرم منفی داشت. از این مشاهدات می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که فعالیت ضدباکتریایی این کمپلکس‌ها به حضور استخلاف Cl و Br مربوط است.

**کلمات کلیدی:** کمپلکس باز شیف، DNA تیموس گوساله، فعالیت ضدباکتریایی.

### ۱ - مقدمه

یکی از خواص لیگاندهای باز شیف این است که می‌توانند با یون‌های فلزات، کمپلکس‌های نسبتاً پایدار تشکیل داده و کمپلکس‌های باز شیف را ایجاد می‌کنند [۱-۳]. کمپلکس‌های باز شیف یکی از مهم‌ترین مدل‌های شیمی فضائی در شیمی کئوردیناسیون فلزات واسطه و فلزات گروه اصلی به شمار می‌روند که این ناشی از تنوع ساختار و امکان سنتز این کمپلکس‌ها می‌باشد. به عنوان مثال بازهای شیف دودندانه NO با روتنیوم کمپلکس‌های پایدار تشکیل می‌دهند [۴].

از زمان سنتز اولین باز شیف، فعالیت ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد توموری این ترکیبات و کمپلکس‌های فلزی آن‌ها به‌طور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ژانک و همکارانش اثر یک‌سری از ترکیبات باز شیف را بر روی باکتری استافیلوکوکوس آئروس مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این ترکیبات توانایی بازدارندگی رشد باکتری را دارا می‌باشند. به باز شیف‌هایی که حاوی اتم‌های الکترون دهنده گوناگونی مثل N، S و O هستند و قابلیت کوئوردینه شدن با فلزات مختلف را دارند به‌عنوان عوامل ضد باکتری امیدوار کننده می‌توان اشاره کرد [۵-۱۱]. مقایسه خواص ضد باکتری باز شیف‌های متعدد و کمپلکس‌های فلزی آن‌ها نشان می‌دهد که هنگام کوئوردینه شدن فلز به لیگاند و با تغییر ساختار کمپلکس، میزان فعالیت بیولوژیکی نسبت به لیگاند تغییر می‌کند [۱۲، ۱۳].

افزایش میزان مرگ و میر مرتبط با بیماری‌های عفونی به‌طور مستقیم مربوط به باکتری‌ها است که از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها ناشی می‌شود. توسعه عوامل ضدباکتری با مکانیزم‌های جدید و عملکرد کارآمدتر، نیاز فوری پزشکی است. هر ماده‌ای که باکتری‌ها را تخریب کرده و مانع تکثیر رشد آن‌ها شود، ضدباکتری نام دارد. رشد و تکثیر باکتری‌ها در هر مکانی تولید بوهای نامطبوع کرده و مصرف مواد ضدباکتری را ضروری می‌نماید. از این‌رو، امروزه خاصیت ضدباکتری بودن بسیار مورد توجه است [۱۴]. بعضی از کمپلکس‌های باز شیف نظیر  $VO[R(SO_3-Sal)_2en]$  برای داشتن خاصیت سمی و فعالیت دارویی جهت بهبود اثر نیز انسولین آزمایش شده‌اند [۱۵].

وانادیم عنصر مهمی در مطالعات زیستی محیطی و بیوشیمی است و به حالت‌های اکسیداسیون (III) و (IV) در سیستم‌های موجودات زنده و باکتری‌ها یافت می‌شود. سمیت وانادیم به حالت اکسایش آن بستگی دارد به‌طوری‌که  $V(V)$  از  $V(IV)$  (به صورت یون وانادیل  $VO^{2+}$ ) سمی‌تر می‌باشد. در سال ۱۹۸۳ یک آنزیم حاوی وانادیم طبیعی به نام برومو پراکسیداز وانادیم (VBPO) در جلبک قهوه‌ای دریایی کشف شد، سپس چندین هالوپراکسوی وانادیم جداسازی و مطالعه شدند. بسیاری از این آنزیم‌ها در جلبک‌های دریایی قهوه‌ای و قرمز شناسائی شدند. تجمع وانادیم به ارگانسیم‌های دریایی محدود نمی‌شود، زیرا هالوپراکسیداز حاوی وانادیم از یک قارچ خوراکی و نیز یک ترکیب وانادیم با وزن مولکولی پایین به نام آماوآدین از یک قارچ سمی جداسازی شدند [۱۶].

برهم‌کنش یون فلزات، کمپلکس‌ها و داروها با DNA از راه‌های متفاوت انجام می‌شود [۱۷]، که شامل برهم‌کنش‌های قوی کووالانسی و برهم‌کنش ضعیف غیر کووالانسی است. امروزه چگونگی برهم‌کنش کمپلکس‌های فلزی با DNA مخصوصاً از طریق شیوه‌های غیر کووالانسی یکی از موضوعات بسیار مورد توجه به منظور کشف داروهای جدید می‌باشد. روش‌های تجربی متعددی برای مطالعه اتصال لیگاند به ماکرومولکول (DNA) وجود دارد که عبارتند از روش دیالیز تعادلی، دیالیز دینامیکی، روش اسپکتروفوتومتری (فرابنفش - مرئی و فلوئورسانس)، روش‌های الکتروشیمیایی، هدایت سنجی و ... که در این تحقیق از روش

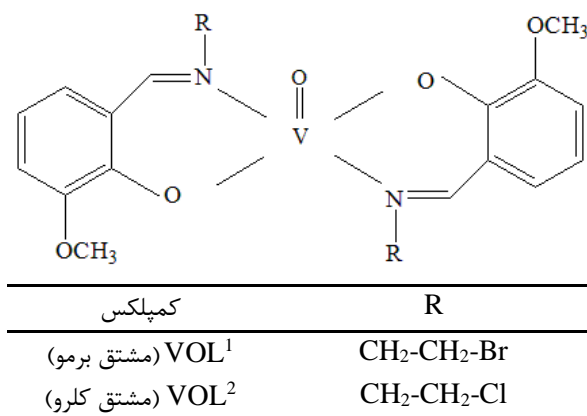
اسپکتروفوتومتری فرابنفش- مرئی و فلورسانس برای بررسی برهم‌کنش کمپلکس‌های باز شیف و انادیل (به عنوان لیگاند) با DNA استفاده شده است. هم‌چنین خواص ضد باکتریایی مشتق‌هایی از کمپلکس‌های باز شیف و انادیل مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاهوری

مواد اولیه و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق همگی از شرکت مرک تهیه شدند. DNA تیموس گوساله (ct-DNA) با خلوص بیولوژی مولکولی، از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شد. ترکیبات باز شیف و انادیل مطابق روش ارائه شده در مراجع سنتز شدند [۱۸، ۱۹]. ساختار این ترکیبات در شکل ۱ نشان داده شده است. از آب مقطر فوق خالص (دیونیزه) برای تهیه محلول‌های آبی مورد نیاز استفاده شد.

داده‌های طیفی مرئی- فرابنفش و مقادیر جذب محلول‌های مختلف بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-vis دوپرتویی Shimadzu مدل 1650PC مجهز به سل‌های کوارتز با قطر ۱۰ میلی‌متر به‌دست آمده است. دستگاه Hitachi مدل MPF-4 جهت اندازه‌گیری‌های طیف سنجی فلورسانس به‌کار گرفته شد. از میکروپیپت‌های Transferpette با دقت بالا که محدوده‌ی ۱۰-۱۰۰۰ میکرولیتر را شامل می‌شود، برای برداشتن حجم دقیق محلول‌ها استفاده شد. توزین‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال Sartorius با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم انجام شد. از pH سنج Metrohm مدل ۸۲۷ جهت اندازه‌گیری مقادیر pH محلول‌ها استفاده شد.



شکل ۱- ساختار کمپلکس‌های باز شیف و انادیل

### ۲-۲- طیف سنجی مرئی- فرابنفش (UV-Vis)

#### ۲-۲-۱- تعیین ضریب جذب مولی کمپلکس‌های باز شیف و انادیل

پس از صفر کردن دستگاه طیف سنج با بافر تریس، طیف محلول کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در غلظت‌های مختلف در محدوده‌ی ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر گرفته شد و مقدار جذب هر محلول در طول موج ماکزیمم و در ناحیه‌ای که کمترین تداخل با طیف DNA داشته باشد، اندازه‌گیری شد.

### ۲-۲-۲- تعیین ثابت اتصال کمپلکس‌های باز شیف وانادیل با DNA

ابتدا دستگاه طیف‌سنج با بافر تریس صفر شد، سپس در سل دستگاه، یک میلی‌لیتر بافر تریس و یک میلی‌لیتر محلول کمپلکس باز شیف وانادیل با غلظت  $2 \times 10^{-4}$  مولار ریخته و پس از آن به مخلوط حاصل، به طور متوالی در شش مرحله، مقادیر ۲۰ میکرولیتری محلول DNA با غلظت  $3/63 \times 10^{-4}$  مولار، اضافه و طیف‌گیری انجام شد.

### ۲-۳- طیف سنجی فلورسانس

یکی دیگر از روش‌های مطالعه مستقیم برهم‌کنش لیگاند با درشت مولکول، طیف‌سنجی فلورسانس است. آزمایشات انجام شده به منظور بررسی برهم‌کنش کمپلکس‌های باز شیف وانادیل با DNA و محاسبه‌ی پارامترهای پیوندی به شرح زیر است:

ابتدا در سل، یک میلی‌لیتر محلول کمپلکس باز شیف وانادیل با غلظت  $2 \times 10^{-4}$  مولار و سپس یک میلی‌لیتر از محلول بافر تریس ریخته شد و طیف‌نشری آن در محدوده ۴۰۰-۶۵۰ نانومتر با طول موج تهییجی  $350 \text{ (}\lambda_{\text{ex}}\text{)}$  نانومتر ثبت گردید. سپس به سل حاوی محلول کمپلکس باز شیف وانادیل رقیق شده، به طور متوالی در شش مرحله، مقادیر ۲۰ میکرولیتری از محلول DNA موردنظر با غلظت  $3/63 \times 10^{-4}$  مولار، اضافه و طیف‌گیری انجام شد.

### ۲-۴- فعالیت ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی کمپلکس‌های باز شیف وانادیل در مقابل باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی بررسی شد. جهت انجام کلیه‌ی آزمایش‌های ضدباکتری محیط کشت استاندارد مولر هینتون آگار مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌هایی از کمپلکس‌های باز شیف وانادیل با غلظت  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  در حلال DMSO (دی متیل سولفو اکسید) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مورد آزمایش در پلیت‌های مولر هینتون آگار کشت داده شدند و سپس دیسک‌های کاغذی استریل ۶ میلی‌متری آغشته شده با ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده از ترکیبات مورد نظر، بر روی پلیت‌های میکروبی قرار گرفتند. در نهایت همه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن ناحیه بازدارندگی (هاله‌ی عدم رشد اطراف هر دیسک) بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و مقادیر میانگین ثبت شد. دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین و استرپتومایسین به‌عنوان نمونه‌های استاندارد در نظر گرفته شد و حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه در برابر این آنتی بیوتیک‌ها با روش مشابه روش قبلی بررسی شد. هم‌چنین یک دیسک حاوی فقط حلال به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- روش اسپکتروفتومتری مرئی-فرابنفش (UV-Vis)

##### ۳-۱-۱- اندازه‌گیری ضرایب جذب مولی لیگاند آزاد

جهت اندازه‌گیری ضرایب جذب مولی کمپلکس‌های باز شیف و انادیل ابتدا جذب دستگاه UV-Vis توسط بافر تریس با قدرت یونی ۱۰ میلی مولار و  $\text{pH} = 7$ ، به عنوان شاهد صفر شد. سپس از محلول هر کمپلکس در غلظت‌های مختلف، در ناحیه‌ی ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر طیف‌گیری شد. طیف‌گیری از محلول هر دو مشتق کمپلکس باز شیف و انادیل به‌طور جداگانه در دمای  $25^\circ\text{C}$  به عمل آمد. با رسم منحنی‌های تغییرات جذب بر حسب غلظت، ضرایب جذب مولی کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در طول موج‌های ماکزیمم مربوط به هر ترکیب، در جایی که با طیف جذبی DNA تداخل نداشته باشد محاسبه گردید. نتایج حاصل در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: ضریب جذب مولی برای ترکیب‌های شیف باز و انادیل در دمای  $25^\circ\text{C}$

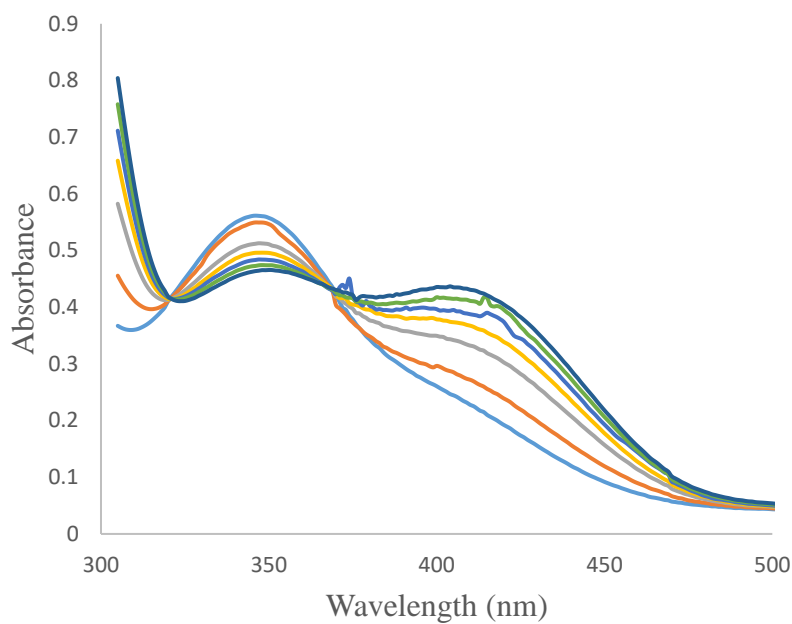
ترکیب	T ( $^\circ\text{C}$ )	$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ )
VOL <sup>1</sup>	۲۵	۳۵۰	۳۹۷۰
VOL <sup>2</sup>	۲۵	۳۵۰	۳۱۷۴

### ۲-۱-۳- اندازه‌گیری ثابت اتصال کمپلکس باز شیف و انادیل با DNA تیموس گوساله (ct-DNA)

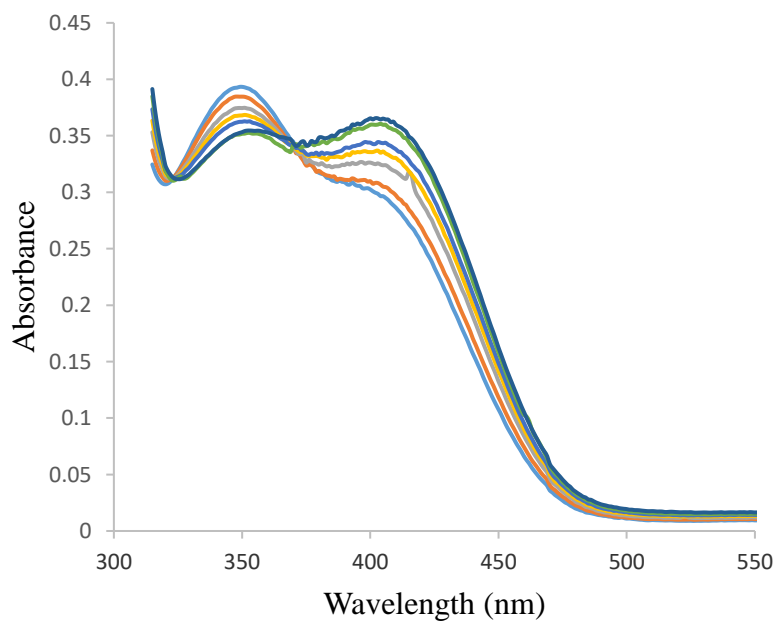
بعد از کالیبره کردن دستگاه توسط بافر تریس ۱۰ میلی مولار و  $\text{pH} = 7/4$ ، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول کمپلکس باز شیف و انادیل با غلظت  $2 \times 10^{-4}$  مولار به علاوه ۱ میلی‌لیتر بافر تریس در سل کوارتز ریخته و در ناحیه ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر طیف‌گیری انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول DNA به محلول رقیق شده کمپلکس باز شیف و انادیل، در سل دستگاه اضافه شد و طیف‌گیری در ناحیه ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر به عمل آمد. افزودن DNA به محلول باز شیف و انادیل در شش مرحله به حجم‌های ۲۰ میکرولیتری ادامه یافت. طیف UV-Vis مربوط به کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف DNA ( $3/6$  تا  $25$  میکرومولار) در  $\text{pH}$  برابر با  $7/4$  و دمای  $25^\circ\text{C}$  در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده، با افزایش غلظت DNA جذب کمپلکس شیف باز و انادیل کاهش می‌یابد که این دلیل واضحی جهت اتصال لیگاند به DNA و تشکیل یک کمپلکس بین DNA با این ترکیبات شیف باز می‌باشد. همچنین در هر یک از طیف‌های UV-Vis نقاط ایزوبستیک در دو طول موج مشاهده می‌شود که این پدیده نشان دهنده تشکیل کمپلکس یک به یک، بین DNA با این ترکیبات شیف باز می‌باشد.

نمودار تغییرات  $[DNA]_{total}/(\epsilon_{app} - \epsilon_f)$  بر حسب  $[DNA]_{total}$  برای مشتق برمو و مشتق کلرو در شکل ۴ نشان داده شده است. با استفاده از معادله ۱ و شیب به دست آمده از نمودار شکل ۴ مقادیر ثابت اتصال ( $K_b$ ) برای کمپلکس‌های DNA-شیف باز تعیین گردید. که این مقادیر، برای مشتق برمو برابر با  $4/35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  و برای مشتق کلرو برابر با  $4/98 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  می‌باشد.

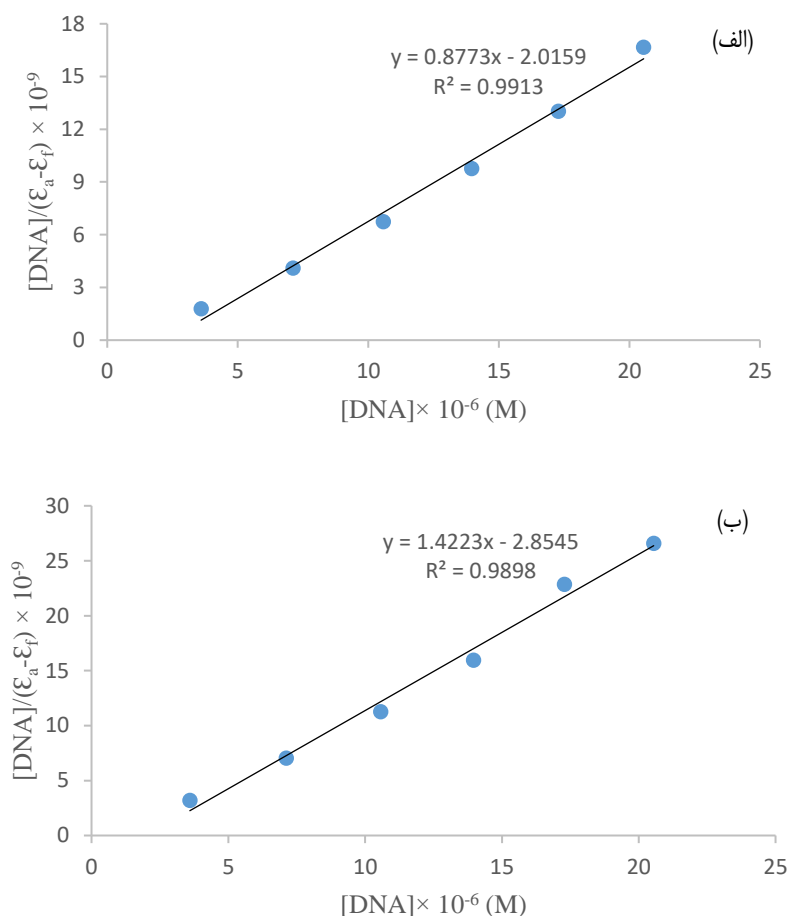
$$[DNA]_{total}/(\epsilon_{app} - \epsilon_f) = [DNA]_{total}/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_{app}(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (1)$$



شکل ۲- طیف UV-Vis مربوط به مشتق برمو کمپلکس باز شیف وانادیل در غیاب و در حضور غلظت های مختلف DNA (۳/۶ تا ۲۵ میکرومولار) در pH برابر با ۷/۴ و دمای ۲۵°C



شکل ۳- طیف UV-Vis مربوط به مشتق کلرو کمپلکس باز شیف وانادیل در غیاب و در حضور غلظت های مختلف DNA (۳/۶ تا ۲۵ میکرومولار) در pH برابر با ۷/۴ و دمای ۲۵°C



شکل ۴- نمودار تغییرات  $[DNA]_{total}/(\epsilon_{app} - \epsilon_f)$  بر حسب  $[DNA]_{total}$  برای (الف)- مشتق برمو و (ب)- مشتق کلرو

### ۳-۲- مطالعه برهم‌کنش کمپلکس‌های باز شیف و انادیل با DNA تیموس گوساله (ct-DNA) به روش

#### اسپکتروفتومتری فلوروسانس

به منظور بررسی برهم‌کنش بین دو مشتق برمو و کلرو از کمپلکس‌های باز شیف و انادیل با ct-DNA از روش اسپکتروفتومتری فلوروسانس استفاده گردید. شدت فلوروسانس DNA خیلی ضعیف است اما کمپلکس‌های باز شیف و انادیل مورد مطالعه در این پژوهش دارای نشر فلوروسانس خوبی می‌باشند. بنابراین، استفاده از فلوروسانس مستقیم برای بررسی برهم‌کنش بین این دو مشتق کمپلکس باز شیف و انادیل با ct-DNA مفید خواهد بود. ناحیه‌ی نشر ماکزیمم این کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در طول موج ۵۱۰ نانومتر می‌باشد. طول موج تهییج برای هر دو کمپلکس در ۳۵۰ نانومتر به‌دست آمد. هم‌چنین محدوده‌ی طول موج نشر هم بین ۴۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر به‌دست آمد.

خاموشی طیف فلوروسانس اشاره به هر فرایندی دارد که شدت فلوروسانس را کاهش دهد [۲۰]. برهم‌کنش‌های متنوعی سبب خاموش شدن فلوروفور می‌گردند که شامل واکنش‌های حالت تهییج، نوآرایی مولکولی، انتقال انرژی، تشکیل کمپلکس مرحله‌ی پایه و خاموشی ناشی از برخورد می‌باشد. در حقیقت دو فرایند خاموشی مشهور وجود دارد، شامل خاموشی استاتیک و خاموشی

دینامیک که در هر دوی این فرایندها باید بین خاموش کننده و فلوروفور ارتباط برقرار شود [۲۱]. خاموشی دینامیک به فرایندی اشاره می‌کند که خاموش کننده- فلوروفور با ایجاد حالت واسطه‌ای در حالت برانگیخته با هم برخورد می‌کنند. خاموشی استاتیک به تشکیل کمپلکس خاموش کننده- فلوروفور اشاره می‌کند. این دو مدل خاموشی از نظر وابستگی دمایی و طول عمر حالت برانگیخته، از یکدیگر قابل تشخیص هستند [۲۲]. پس در هر دو مورد شدت فلوروسانس به غلظت خاموش کننده بستگی دارد و تشکیل کمپلکس خاموش کننده- فلوروفور به عنوان یک عامل خاموشی است [۲۳].

شکل‌های ۵ و ۶، طیف فلوروسانس دو کمپلکس باز شیف و انادیل (لیگاند) در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف DNA را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت DNA شدت نشر فلوروسانس ترکیبات شیف باز به طور منظمی (همراه با بلو شیفت) کاهش می‌یابد. یعنی افزایش DNA باعث خاموشی طیف فلوروسانس ترکیبات شیف باز شده است که این نشان دهنده انجام برهم‌کنش بین ترکیبات شیف باز با DNA می‌باشد. نمودار تغییرات  $\log(F_0-F)/F$  بر حسب  $\log [DNA]$  برای کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در شکل ۷ نشان داده شده است. با استفاده از شیب و عرض از مبدا نمودار شکل ۷ و معادله (۲) می‌توان ثابت پیوند ( $K_f$ ) و تعداد مکان‌های اتصال ( $n$ ) را به دست آورد، که در آن  $F_0$  و  $F$  شدت فلوروسانس در غیاب و در حضور DNA می‌باشد.  $[Q]$  غلظت خاموش کننده (در این جا DNA) است.

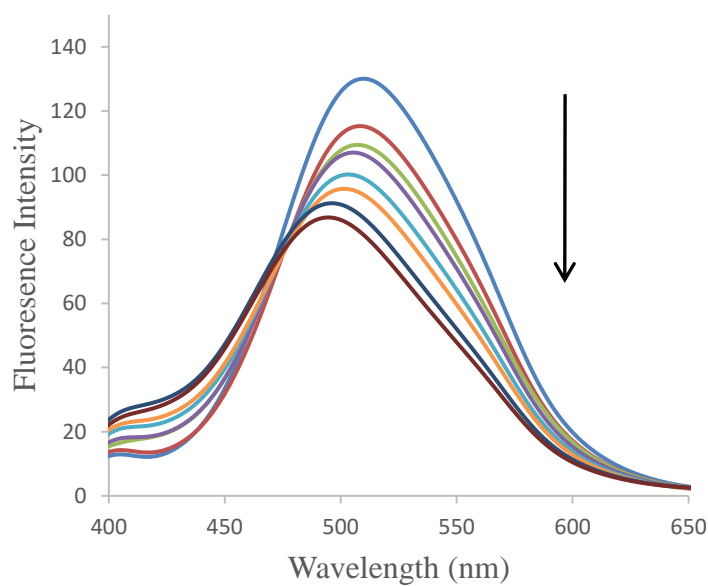
$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

ثابت اتصال و تعداد جایگاه اتصال به دست آمده، در جدول (۲) آورده شده است.

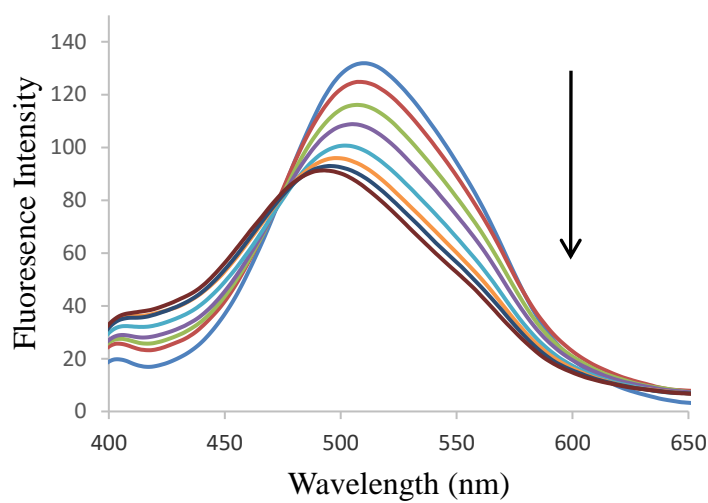
جدول ۲: ثابت اتصال و تعداد جایگاه اتصال کمپلکس‌های باز شیف و انادیل با DNA

نام ترکیب	$K_f$	$n$	$R^2$
VOL <sup>1</sup>	$2/10 \times 10^5$	۱/۱۹	۰/۹۹۴۷
VOL <sup>2</sup>	$2/49 \times 10^5$	۱/۲۱	۰/۹۹۶۲

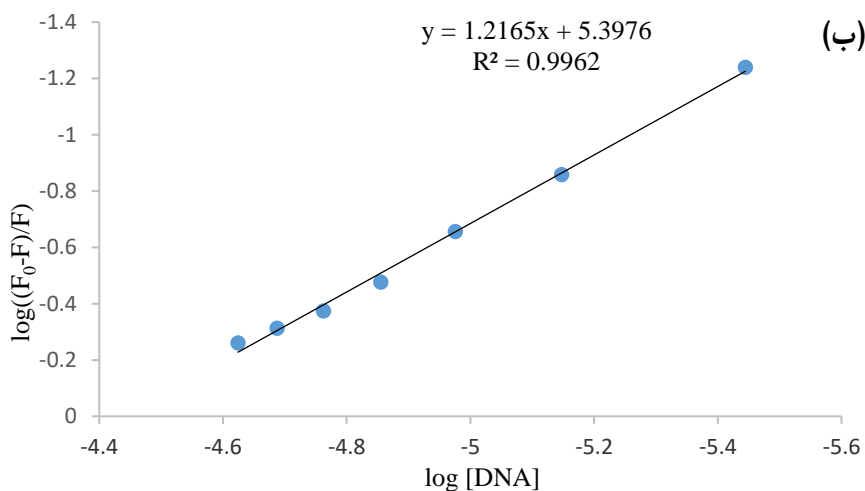
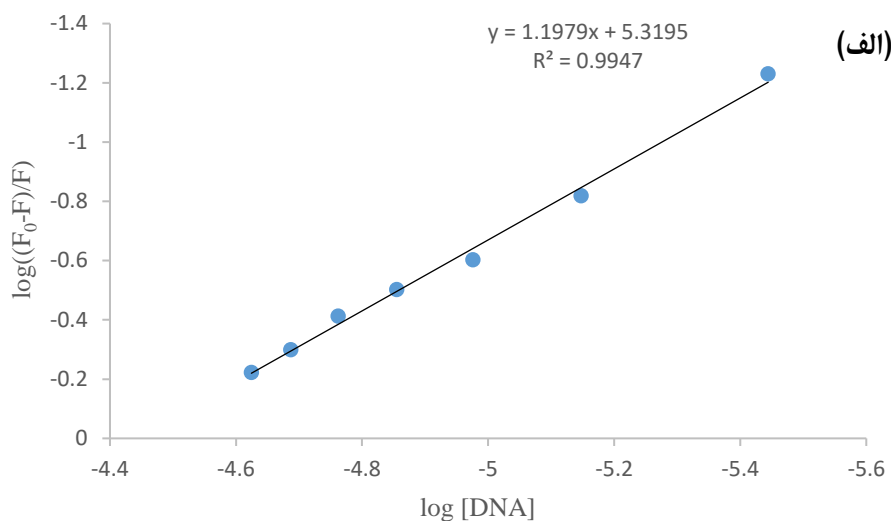




شکل ۵- طیف فلورسانس مشتق برمو کمپلکس باز شیف در حضور غلظت‌های مختلف DNA (۳/۶ تا ۲۵ میکرو مولار) در pH برابر با ۷/۴ و دمای ۲۵°C



شکل ۶- طیف فلورسانس مشتق کلرو کمپلکس باز شیف در حضور غلظت‌های مختلف DNA (۳/۶ تا ۲۵ میکرو مولار) در pH برابر با ۷/۴ و دمای ۲۵°C



شکل ۷- نمودار تغییرات  $\log (F_0-F)/F$  برحسب  $\log [DNA]$  برای کمپلکس های باز شیف وانادیل (الف- مشتق برم، ب- مشتق کلرو)

برای شناخت مکانیسم خاموش سازی، معادله استرن ولمر (معادله ۳) به کار برده شد [۲۴].

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] = K_q \tau_0 \quad (۳)$$

در اینجا  $F_0$  و  $F$  شدت فلورسانس در غیاب و در حضور خاموش کننده می باشد.  $[Q]$  غلظت خاموش کننده (در اینجا DNA)،  $K_q$  ثابت خاموشی فلوروفور در غیاب خاموش کننده و  $K_{sv}$  ضریب خاموشی استرن ولمر (بر حسب مول بر لیتر) است. نمودار تغییرات  $F_0/F$  برحسب  $[Q]$  برای کمپلکس های باز شیف وانادیل (مشتق برم و مشتق کلرو) ضمن افزایش DNA، در شکل ۸ و ۹ نشان داده شده است و  $K_{sv}$  از شیب این نمودار به دست می آید.

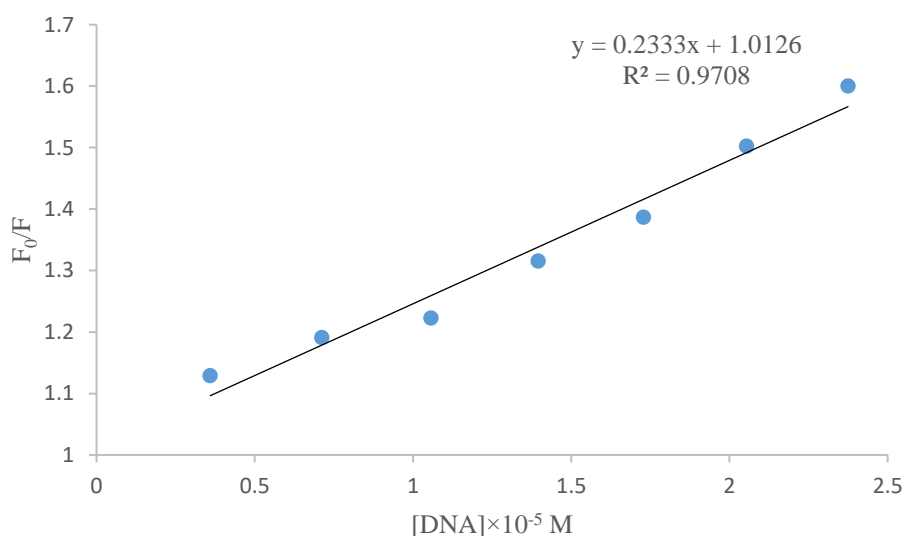
جدول ۳: مقادیر ضریب خاموشی استرن ولمر ( $K_{sv}$ ) و  $Kq$  برای برهم کنش بین کمپلکس های باز شیف وانادیل با DNA

نام ترکیب	$K_{sv} \times (10^3/M)$	$k_q \times (10^{11}/Ms)$	$R^2$
VOL <sup>1</sup>	۲/۳۳	۲/۳۳	۰/۹۷۰۸
VOL <sup>2</sup>	۲/۵۲	۲/۵۲	۰/۹۹۴۴

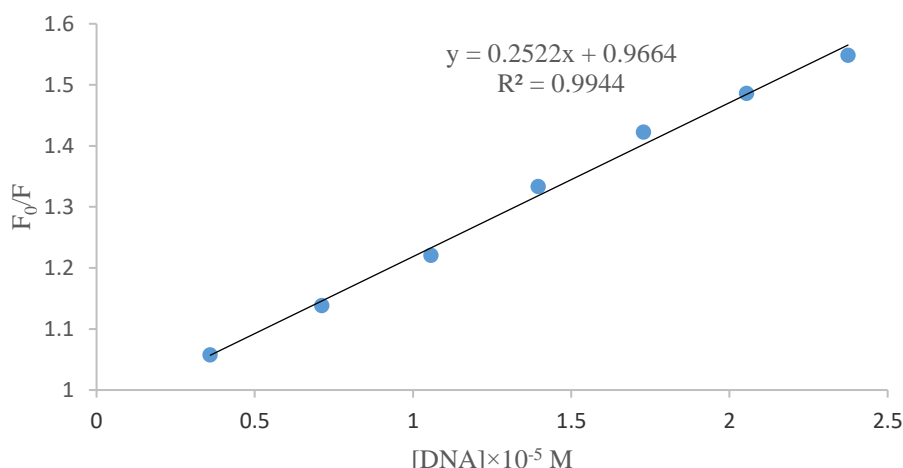
$K_{sv}$  بر طبق معادله ۴ به  $(\tau_0)$  ارتباط داده می شود:

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (۴)$$

برای محاسبه  $Kq$  از روی  $K_{sv}$ ، معمولا  $\tau_0$  برای یک مولکول زیستی به طور تقریبی برابر با  $10^{-8}$  ثانیه در نظر گرفته می شود [۲۵]. مقادیر  $K_{sv}$  و  $Kq$  محاسبه شده، در جدول ۳ آورده شده است. در خاموش سازی دینامیک مقدار ماکزیمم  $Kq$  برابر با  $2/0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$  می باشد. در این تحقیق مقادیر  $Kq$  محاسبه شده برای هر دو مشتق شیف باز وانادیل از مقدار ذکر شده بیشتر است، بنابراین طبیعت خاموش سازی در هر دو مورد از نوع استاتیک می باشد. چون اندازه مولکول آنقدر بزرگ است که خاموشی نمی تواند از نوع دینامیک باشد [۲۶].



شکل ۸- نمودار تغییرات  $F_0/F$  برحسب  $[DNA]$  برای مشتق برمو کمپلکس باز شیف وانادیل ضمن افزایش DNA



شکل ۹- نمودار تغییرات F<sub>0</sub>/F برحسب [DNA] برای مشتق کلرو کمپلکس‌های باز شیف و انادیل ضمن افزایش DNA

### ۳-۳- بررسی خواص ضدباکتریایی

مطالعه خواص ضدباکتریایی دو مشتق برم و کلرو از کمپلکس‌های باز شیف و انادیل در مقایسه با دو داروی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های به کار رفته در این پژوهش شامل باکتری گرم مثبت استفیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی بودند. بررسی‌ها بر اساس اندازه‌گیری قطر منطقه بازدارندگی (هاله عدم رشد اطراف هر دیسک) بود. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۴ مشاهده شد که هر دو مشتق کمپلکس‌های باز شیف و انادیل، فعالیت ضدباکتری خوبی در برابر هر دو نوع باکتری داشتند و در این بین، ترکیب حاوی کلر دارای منطقه بازدارندگی بزرگتری است و فعالیت ضدباکتری بیشتری نسبت به ترکیب حاوی برم در برابر باکتری‌های گرم منفی از خود نشان داد. بنابراین کمپلکس‌های باز شیف و انادیل ممکن است که عامل ضدباکتری مفیدی در این موارد به حساب آیند.

جدول ۴: نتایج فعالیت ضدباکتری کمپلکس‌های باز شیف و داروهای استاندارد

نمونه	قطر منطقه بازدارندگی (میلی‌متر)	
	Gram-positive Staphylococcus aureus	Gram-negative Escherichia coli
کنترل (DMSO)	۰	۰
جنتامایسین (GM10)	۱۹	۲۲
استرپتومایسین (S10)	۱۳	۱۸
VOL <sup>2</sup>	۱۰	۱۵
VOL <sup>1</sup>	۱۰	۱۷

### ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش به مطالعه‌ی برهم‌کنش دو مشتق هالوژنه از کمپلکس‌های باز شیف و انادیل با DNA تیموس گوساله (ct-DNA) در دمای محیط، pH برابر با ۷/۴ و شرایط فیزیولوژیک توسط روش‌های طیف‌سنجی مرئی-فرا بنفش و طیف‌سنجی نشری

فلورسانس پرداخته‌ایم. این کمپلکس‌های باز شیف وانادیل دارای نقش ضد توموری بوده و امروزه مورد توجه طراحان ترکیبات دارویی قرار گرفته‌اند. به همین دلیل امکان برهم‌کنش این ترکیبات با DNA جهت مهار تقسیم DNA، مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات طیف جذبی اثر DNA بر هر دو کمپلکس باز شیف وانادیل مورد بررسی قرار گرفت و انرژی آزاد اتصال به دست آمد. نتایج نشان داد که انرژی اتصال با DNA برای مشتق کلرو از انرژی اتصال مشتق برم بزرگتر می‌باشد. وجود نقاط ایزوبستیک در طیف جذبی هر دو مشتق کمپلکس باز شیف در دو طول موج دلیلی بر تشکیل کمپلکس یک به یک، بین DNA با این ترکیبات باز شیف می‌باشد. مطالعات فلورسانس کمپلکس‌های باز شیف وانادیل نیز نشان داد که مقدار ثابت پیوندی ( $k_f$ )، تعداد جایگاه اتصال ( $n$ )، ضریب خاموشی ( $K_{sv}$ ) و ثابت خاموشی فلوروفور، برای مشتق کلرو بیشتر از مشتق برم بوده که نشان دهنده برهم‌کنش قوی‌تر مشتق کلرو با DNA می‌باشد که با نتایج طیف سنجی مرئی - فرا بنفش مطابقت دارد.

نتایج آزمایش ضد باکتریایی نشان داد که هر دو مشتق کمپلکس‌های باز شیف وانادیل، فعالیت ضد باکتری خوبی در برابر هر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی داشتند و با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که مشتق حاوی گروه عاملی کلر دارای فعالیت ضد باکتری بیشتری نسبت به مشتق حاوی گروه عاملی برم در برابر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. مقایسه نتایج فعالیت ضدباکتری کمپلکس‌های باز شیف مورد مطالعه در این تحقیق با کمپلکس‌های فلزی باز شیف در مراجع دیگر، در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵: مقایسه نتایج فعالیت ضدباکتری کمپلکس‌های باز شیف مورد مطالعه با دیگر کمپلکس‌های فلزی باز شیف

نمونه	قطر منطقه بازدارندگی (میلی متر)	
	Gram-positive Staphylococcus aureus	Gram-negative Escherichia coli
VOL <sup>2</sup>	۱۰	۱۵
VOL <sup>1</sup>	۱۰	۱۷
(مرجع ۲۷) (HL)(VO) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )(H <sub>2</sub> O).4H <sub>2</sub> O	۱۶	۱۵
(مرجع ۲۸) [Co <sup>III</sup> (H <sub>2</sub> hpac)py <sub>3</sub> ]PF <sub>6</sub>	۱۲	۸
(مرجع ۲۹) Cusal-NH <sub>2</sub> Y	۱۲	-
(مرجع ۲۹) Mnsal-NH <sub>2</sub> Y	۱۵	۱۰

## ۵- مراجع

- [1] C.P. Johnson, J.L. Atwood, J.W. Steed, C.B. Baner, R.D. Rogers, *Inorg. Chem.* **35** (1996) 2602.
- [۲] بهزاد، مهدی؛ اطمینانی، سعید؛ مجله شیمی کاربردی، شماره ۲۲ (۱۳۹۱) ص ۳۱.
- [۳] بوربور اژدری، فرشاد؛ بهزاد، مهدی، مجله شیمی کاربردی، شماره ۳۷ (۱۳۹۴) ص ۱۰۱.
- [4] V. Dragutan, I. Dragutan, *Platinum. Metals. Rev.* **49** (2005) 33.
- [5] A.S. Shawali, C.J. Párkanyi, *Heterocycl. Chem.* **17** (1980) 833.

- [6] A.M. Stadler, J. Harrowfield, *Inorg. Chim. Acta.* **362** (2009) 4298.
- [7] A. Kulkarni, P.G. Avaji, G.B. Bagihalli, S.A. Patil, P.S. Badami, *J. Coord. Chem.* **62** (2009) 481.
- [8] M.F. Iskander, L. El-Sayed, N.M.H. Salem, W. Haase, H.J. Linder, S. Foro, *Polyhedron.* **23** (2004) 23.
- [9] V.P. Singh, *Spectrochim. Acta. Part A.* **71** (2008) 17.
- [10] K. Narang, V. Singh, E.S.R. Transition. *Met. Chem.* **21** (1996) 507.
- [11] P. Barbazán, R. Carballo, B. Covelo, C. Lodeiro, J.C. Lima, E.M. Vázquez-López, *Eur. J. Inorg. Chem.* **17** (2008) 2713.
- [12] E. Īspir, *Dyes and Pigments.* **82** (2009) 13.
- [۱۳] جواهریان، محمد؛ کاظمی، فواد؛ معتمدی، حسین؛ رجب کلانترزاده، محمد، *مجله شیمی کاربردی*، شماره ۴۲ (۱۳۹۶) ص ۹.
- [14] F. Zamani, M. Zendehtdel, A. Mobinikhaledi, M. Azarkish, *Microporous. Mesoporous. Materials.* **212** (2015) 18.
- [15] R. Rajavel, M. Senthil Vadivu, C. Anitha, *J. Chemistry.* **5** (2008) 620.
- [16] M.R. Maurya, *Coord. Chem. Rev.* **237** (2003) 163.
- [17] C.S. Chow, J.K. Barton, *Meth. Enzym.* **212** (1992) 219.
- [18] G. Grivani, V. Tahmasebi, A. DehnoKhalaji, V. Eigner, & M. Dusek, *J. Coord. Chem.* **67** (2014) 3664.
- [19] G. Grivani, V. Tahmasebi, A. DehnoKhalaji, K. Fejfarov, & M. Dusek, *Polyhedron*, **51** (2013) 54.
- [20] M.R. Eftink, C.A. ghiron, *J. Biochem.* **114** (1981) 199.
- [21] Y. Sun, S. Bi, i. Song, D.C. Qiao, D. Mu, H. Zhong, *J. Sens.* **34** (1998) 675.
- [22] F.L. Cui, J. Fan, J.P. Li, Z.D. Hu, *J. Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 151.
- [23] P.B. Kandagal, S.M.T. Shaikh, D.H. Manjunatha, J. Seetharamappa, *J. Photochem. Photobiol. A.* **189** (2001) 121.
- [24] T. Chen, H. Cao, S. Zhu, Y. Lu, Y. Shang, M. Wang, L. Zhu, *Mol. Bio.* **81** (2011) 645.
- [25] Y.J. Hu, G. Yu, J. Yong, X.Y. Liu, *Spectrochim. Acta A.* **65** (2006) 988.
- [26] T. Yamanaka, S. Otsuka, *Metalloproteins.* Elsevier. Amsterdam (1998) 285.
- [27] M. Shebl, *Spectrochim. Acta A.* **117** (2014) 127.
- [28] M. Salehi, G. Dutkiewicz, A. Rezaei, A. Amoozadeh, S. Rahmani, G.H. Grivani, M. Kubicki, *J. Chem. Crystallogr.* **42** (2012) 871.

[۲۹] زنده دل، مژگان؛ مرتضی‌ئی، زهره، *مجله سلول و بافت*، شماره ۱ (۱۳۹۶) ص ۶۹.