



Evaluation of binding affinity of synthesized coumarin derivative on single-stranded DNA by spectroscopic methods

Sargolzaei J^{a*}, Khaghaninejad S^b

^a Biology Faculty, Arak University, Arak, Iran

^b Chemistry Faculty, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Sargolzaei J, Khaghaninejad S. Evaluation of binding affinity of synthesized coumarin derivative on single-stranded DNA by spectroscopic methods. Journal of Cell and Tissue. 2022;13(1):23-33

<https://10.52547/JCT/13.1.23>

KEYWORDS

3-(tetrazole-5-yl) coumarin, Single-stranded DNA, Fluorescence spectroscopy, Circular dichroism spectroscopy

ABSTRACT

Aim: According to the importance of coumarin derivatives as an effective medication on cancer cells and various other therapeutic effects, in this study we investigated the effect of a new derivative of coumarin named 3- (tetrazol-5-yl) coumarin on single-stranded DNA by different spectroscopic methods in solution.

Material and Methods: The present study has investigated the effect of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin on single-stranded DNA in vitro. The findings demonstrates that the rate of single strand DNA absorption enhances by interaction with 3-(tetrazol-5-yl) coumarin at 210 and 260 nm. The fluorescence intensity of single-stranded DNA increases in a concentration-dependent of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin, indicating the binding of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin to the chromophores in single-stranded DNA.

Results: Binding of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin to single-stranded DNA causes a significant increase in ellipticity in circular dichroism of DNA molecules in the regions of 220 and 275 nm which is more positive at 245 nm. The results indicate a stronger binding of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin to single-stranded DNA, which may be due to the fact that single-stranded DNA may be more available during replication.

Conclusion: The results obtained from the effect of 3- (tetrazol-5-yl) coumarin on single-stranded DNA can provide valuable information to design medications by coumarin derivatives which have more anti-tumor effect and less side effects.

* Corresponding author. Tel.: +98-86-32627230 ; Fax: +98-86-34173406

E-mail address: j-sargolzaei@araku.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.1.23>

Received: February 22, 2022; Received in revised form: April 19, 2022; Accepted: May 1, 2022

© Author





بررسی تمایل اتصال مشتق کومارین سنتز شده بر DNA تک رشته‌ای با روش‌های اسپکتروسکوپی

جواد سرگلزائی^{۱*}، سهیلا خاقانی نژاد^۲

^۱ استادیار، زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران J-sargolzaei@araku.ac.ir

^۲ مربی، شیمی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
<p>۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین، DNA تک رشته، اسپکتروسکوپی فلورسانس، اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی دورانی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱</p>	<p>هدف: باتوجه به اهمیت مشتقات کومارین به‌عنوان داروی موثر بر سلول‌های سرطانی و اثرات درمانی متنوع دیگر، در این پژوهش بررسی تاثیر مشتق جدیدی از کومارین به‌نام ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به DNA تک رشته در محلول با استفاده از روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی مورد مطالعه قرار دادیم.</p> <p>مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر به بررسی اثر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین بر DNA تک رشته در شرایط آزمایشگاهی پرداخته است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان روند جذب DNA تک رشته در اثر میان‌کنش با ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۶۰ نانومتر افزایش می‌یابد. طیف نشری DNA تک رشته در یک روند وابسته به غلظت ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین افزایش می‌یابد، که نشان‌دهنده اتصال ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با کروموفورهای موجود در DNA تک رشته است.</p> <p>نتایج: اتصال ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به DNA تک رشته‌ای سبب افزایش قابل توجه ellipticity دورنگ نمایی دورانی ملکول DNA در نواحی ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر و مثبت‌تر شدن آن در ۲۴۵ نانومتر می‌شود. نتایج حاکی از اتصال قوی تر داروی ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به DNA تک رشته می‌باشد که می‌تواند به این دلیل باشد که احتمالاً DNA تک رشته در هنگام همانندسازی بیش‌تر در دسترس است.</p> <p>نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده از اثر کومارین ۳- (تترازول-۵-ایل) بر روی DNA تک رشته‌ای می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه طراحی داروهای با مشتقات کومارینی با اثر ضدتوموری بیش‌تر و عوارض جانبی کم‌تری در اختیار قرار دهد.</p>

۱- مقدمه

باوجود تلاش دانشمندان و پیشرفت علم و تکنولوژی، سرطان هنوز از مهلک‌ترین بیماری‌های بشر است و بنابراین تحقیق بر روی این بیماری و راه‌های درمان آن بسیار مورد توجه می‌باشد. لذا شناسایی مکانیسم اثر داروهای ضدسرطانی برای به‌کار بردن موثرتر آن‌ها در درمان انواع سرطان می‌تواند مهم باشد. هسته مهم‌ترین ارگانی است که در سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد و هدف بسیاری از ترکیبات جدید و هم‌چنین داروهای ضدسرطان، هسته سلول می‌باشد. DNA در داخل هسته سلول‌های یوکاریوتی در هنگام همانندسازی یا رونویسی برهنه استولی در به‌طور معمول، همراه با پروتئین‌های هیستونی و

غیرهیستونی است که باهم ساختارهایی به نام نوکلئوزوم را می‌سازند که کروماتین نامیده می‌شوند. از این رو داروهای ضدتوموری برای انجام عمل خود می‌توانند DNA را چه به صورت تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای مورد هدف قرار دهند (۱-۳).
 کومارین‌ها به طور گسترده در زمینه زیست‌شناسی، پزشکی و علوم پلی‌مری یافت می‌شوند. شناخته‌شده‌ترین و مهم‌ترین کومارین "وارفارین" است که در دوزهای پایین به عنوان رقیق‌کننده خون تجویز می‌شود. کومارین‌های متعددی به عنوان دارو در پزشکی معاصر و اخیر استفاده می‌شود. کومارین و مشتقات آن هم‌چنین طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف از جمله فعالیت‌های ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدسرطانی، ضدانعقاد و ضد HIV را نشان می‌دهند. کومارین و مشتقات آن هم‌چنین طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف از جمله ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدسرطانی، ضدلخته شدن، فعالیت‌های ضد HIV، ضد ویروسی، ضد ویروسی را نشان می‌دهند (۲، ۳). آن‌ها هم‌چنین به عنوان مواد تشکیل دهنده در عطر، لوازم آرایشی، افزودنی در مواد غذایی، دارویی، در تهیه حشره‌کش‌ها، روشن‌کننده‌های نوری، و رنگ‌های فلورسنت پراکنده و لیزری استفاده می‌شوند. کومارین‌ها به دلیل سمیت و سرطان‌زایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، آن‌ها اثرات فتودینامیک را نشان می‌دهند و واسطه‌های مفیدی برای سنتز فوروکومارین‌ها، کرومن‌ها، کومارون‌ها و ۲-آسیلرسورسینول‌ها هستند (۴، ۵).

تترازول‌ها در فارماکوکینتیک و متابولیسم دارورسانی شرکت می‌کنند. بنابراین، آن‌ها همیشه کاندید خوبی برای اتصال و اثر بخشی بر روی پروتئین و DNA می‌باشند. ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به عنوان ایمیدازوکومارین یک مشتق کومارین است که با موفقیت از طریق دومینو Knoevenagel سنتز می‌شود. این مشتق کومارین در تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌های پوستی شرکت می‌کند و باعث آسیب در ساختار DNA و پروتئین در سلول می‌شود که به دنبال آن سبب ایجاد سرطان در انسان می‌شود (۶-۹). با در نظر گرفتن مطالب گفته شده، هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر این مشتق کومارین بر DNA تک رشته غده تیموس گوساله می‌باشد. استفاده از غده تیموس گوساله به علت دارا بودن میزان بالای DNA نسبت به پروتئین این امکان را برای ما فراهم کرد تا اثر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین را بر روی DNA خالص بررسی کنیم.

1- مواد و روش‌ها

۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به عنوان ایمیدازوکومارین یک مشتق کومارین است که از طریق واکنش ترکیب‌های کربونیل‌دار فعالی مانند مشتق‌های ایزاتین، آلدئیدهای آروماتیک با مالونیتریل، سنتز فرآورده را از طریق یک واکنش دومینو چند جزئی (تراکم ناووناگل/حلقه افزایشی ۱ و ۳-دوقطبی) بدون استفاده از هیچ‌گونه کاتالیزوزی در حلال آب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود (۱۰). ۲ میلی‌گرم از مشتق کومارین با ۱ میلی‌لیتر محلول بافر تریس خریداره شده از شرکت مرک آلمان ترکیب نموده و محلول در یخچال نگهداری شد. DNA تک رشته غده تیموس از شرکت SIGMA خریداری شد. جهت آماده‌سازی محلول DNA به مقدار ۲ میلی‌گرم از پودر DNA با ۱ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۴ ترکیب و محلول در یخچال نگهداری شد.

اسپکتروسکوپی UV/Vis: میان‌کنش ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته با استفاده از بافر تریس اسیدی ۱۰ میلی‌مولار (pH ۷/۲)، در دمای اتاق و به دور از نور انجام گرفت. بدین منظور غلظت ثابتی از DNA تک رشته تهیه و با غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین به مدت یک ساعت انکوبه و پس از اتمام زمان مورد نظر، به منظور مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis مورد استفاده قرار گرفت.

میزان جذب محلول حاصل از میان‌کنش ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته و نیز میزان جذب غلظت‌های مختلف دارو در بافر تریس اسیدی در ۲۱۰ و ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Carry 100 مدل Bio-Varian

ساخت کشور استرالیا خوانده شد و پس از انجام محاسبات لازم منحنی‌های مربوطه رسم شد.

اسپکتروسکوپی فلورسانس: به منظور انجام مطالعات اسپکتروسکوپی فلورسانس، ابتدا غلظت ثابتی DNA تک رشته با غلظت‌های مختلف ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین در دمای اتاق و به دور از نور به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از سپری شدن مدت زمان معین، محلول حاصل از میان‌کنش ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته در طول موج ۲۵۸ نانومتر تهییج و طیف نشر آن‌ها در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر Carry Eclipse مدل Bio-Varian و ساخت کشور استرالیا رسم شد. محلول حاصل از میان‌کنش DNA تک رشته با ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین نیز در طول موج ۲۵۸ نانومتر تهییج و طیف نشر فلورسانس آن در محدوده ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر رسم شد. هم‌چنین طیف نشر نمونه‌های استاندارد ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین در محدوده ذکر شده رسم و سپس از میزان نشر نمونه‌های تیمار شده کسر شد. در طول انجام آزمایشات Slit‌های تهییجی و نشری به ترتیب ۱۰ و ۵ نانومتر در نظر گرفته شد و از کووت کوارتز با عرض یک سانتی‌متر استفاده شد. پس از رسم منحنی‌های حاصل از میان‌کنش، با توجه به اطلاعات به دست آمده منحنی $I_0 - I / I_0 \times 100$ در برابر غلظت‌های مختلف دارو رسم شد. I_0 در این فرمول شدت نشر فلورسانس در غیاب دارو و I شدت نشر فلورسانس در حضور غلظت‌های مختلف دارو می‌باشد. هم‌چنین ثابت معادله اشترن-ولمر (Ksv) برای تخمین میزان خاموشی فلورسانس محاسبه شد (۱۰). در معادله اشترن-ولمر $I_0 / I = 1 + Ksv [Q]$ ، I_0 و I به ترتیب مقدار نشر ذاتی در غیاب و حضور خاموش‌کننده (۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین)، $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده، Ksv ثابت خاموشی اشترن-ولمر فلورهای در معرض خاموش‌کننده می‌باشد (۱۲، ۱۳). براین اساس Ksv برای ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین به عنوان شیب نمودار I_0 / I بر غلظت‌های مختلف ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین به دست آمد.

اسپکتروسکوپی CD. به منظور مطالعه تغییر ساختار دوم، پس از میان‌کنش DNA تک رشته با ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین، از اسپکتروسکوپی CD استفاده شد. مطالعه CD در ناحیه Near-UV و به ترتیب در محدوده طول موج‌های ۲۰۰-۳۲۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر AVIV مدل ۲۱۵ با کووت کوارتز با عرض ۱ سانتی‌متر برای ناحیه نزدیک و کووت با عرض ۱ میلی‌متر برای ناحیه دور و تحت جریان مداوم گاز ازت و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. طیف نمونه‌های میان‌کنش از طیف نمونه‌های استاندارد داروی ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین که در همین شرایط رسم شده بودند، کسر و داده‌ها تحت عنوان (Molar Ellipticity) و به صورت $[\Theta]: \text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ گزارش شدند (۱۴).

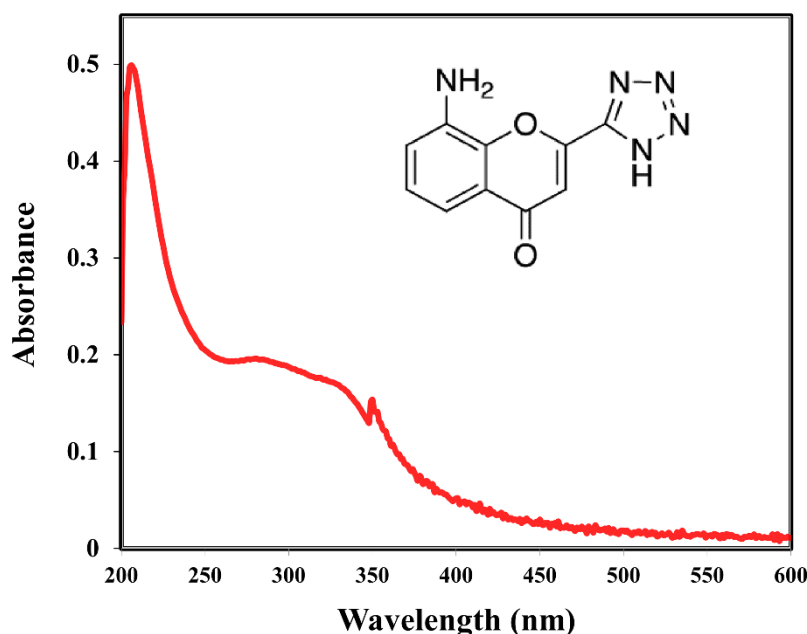
2- نتایج

مطالعه میان‌کنش ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی

اسپکتروسکوپی جذبی یکی از روش‌های مناسب برای مطالعه ساختار ماکرومولکول‌ها است. به منظور بررسی خصوصیات اسپکتروسکوپی ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین، ابتدا طیف جذبی این ترکیب بین طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر رسم شد (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود طیف جذبی این دارو دارای یک قله جذبی بلند در ۲۱۰ نانومتر و چند قله جذبی کوتاه در ۲۰۸، ۲۸۰، ۳۲۰ و ۴۳۹ نانومتر می‌باشد. لذا با توجه به طیف جذبی، طول موج ۲۱۰ نانومتر به عنوان جذب شاخص ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین انتخاب شد.

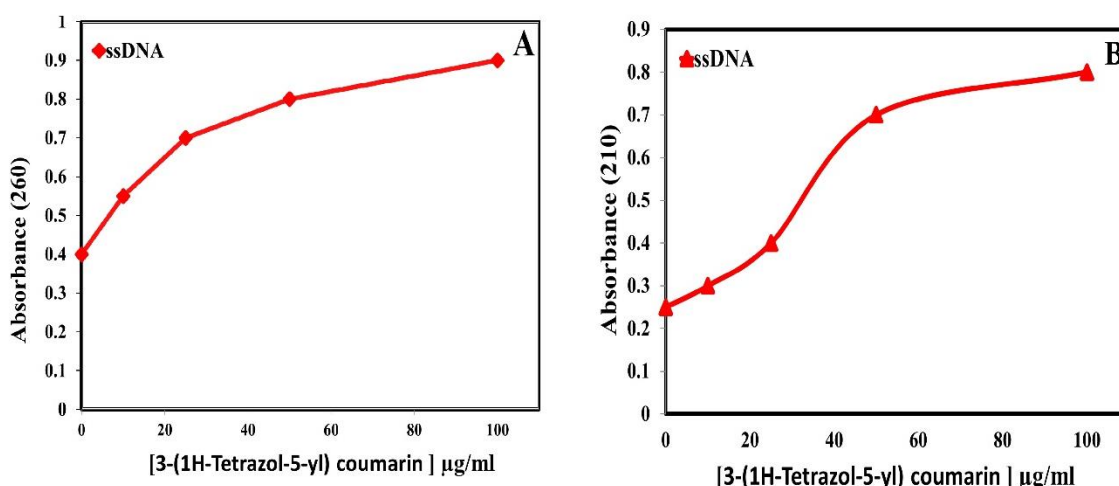
مطالعه میان‌کنش ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی

اسپکتروسکوپی جذبی یکی از روش‌های مناسب برای مطالعه ساختار ماکرومولکول‌ها است. به منظور بررسی خصوصیات اسپکتروسکوپی ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین، ابتدا طیف جذبی این ترکیب بین طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر رسم شد (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود طیف جذبی این دارو دارای یک قله جذبی بلند در ۲۱۰ نانومتر و چند قله جذبی کوتاه در ۲۰۸، ۲۸۰، ۳۲۰ و ۴۳۹ نانومتر می‌باشد. لذا با توجه به طیف جذبی، طول موج ۲۱۰ نانومتر به عنوان جذب شاخص ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین انتخاب شد.



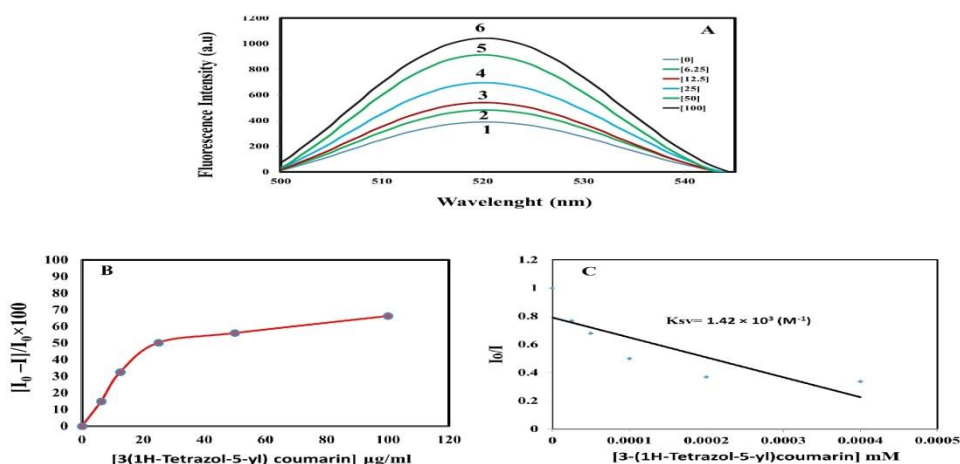
شکل ۱. طیف جذبی داروی ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر.

به منظور بررسی تغییرات جذب نمونه‌های انکوبه شده با ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین از روش طیف‌سنجی جذبی UV/vis استفاده شد. طیف‌سنجی جذبی روشی مفید برای مطالعه ساختار ماکرومولکول‌های مختلف است و از طرفی دیگر این روش یکی از ساده‌ترین و رایج‌ترین روش‌ها برای مطالعه میان‌کنش لیگاند-ماکرومولکول است. ابتدا میزان جذب نمونه‌های استاندارد ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در هر غلظت از مقدار جذب نمونه‌های تیمار شده با غلظت مشابه ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین کسر و نمودار تغییرات جذب DNA تک رشته برحسب غلظت دارو رسم شد. شکل ۲ تغییرات میزان جذب محلول‌های حاصل از میان‌کنش داروی ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر (A) و ۲۱۰ نانومتر (B) را نشان می‌دهد و همان‌طور که مشاهده می‌شود تغییرات جذب DNA تک رشته یک روند مشابه را طی می‌کنند. شکل ۲-A به صورت مقایسه‌ای روند تغییرات میزان جذب DNA تک رشته پس از انکوباسیون با ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در طول موج ۲۶۰ نانومتر را نشان می‌دهد. در غلظت‌های مختلف میزان جذب DNA تک رشته افزایش می‌یابد و در غلظت‌های بالاتر نیز هم‌چنین جذب افزایش می‌یابد. در حالی که کاهش جذب در اثر میان‌کنش دارو با DNA در هیچ طول موج مشاهده نشد. همان‌طور که در شکل ۲-B مشاهده می‌شود در اثر میان‌کنش داروی ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته در طول موج ۲۱۰ نانومتر در حضور همه غلظت‌های دارو جذب روند افزایشی را نشان می‌دهد. مشاهده دقیق‌تر نشان می‌دهد در غلظت پایین و بالای ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین میزان جذب در غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین افزایش می‌یابد.



شکل ۲. مقایسه تغییرات میزان جذب DNA تک رشته پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر (A) و ۲۱۰ نانومتر (B).

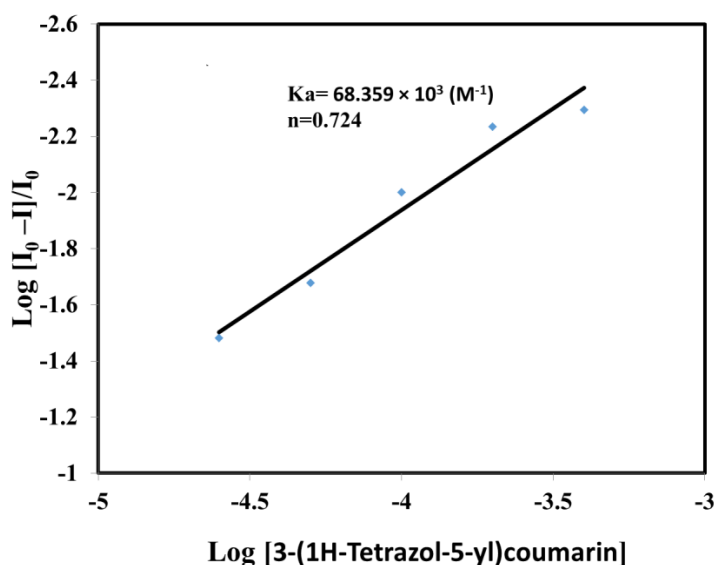
در ادامه به منظور بررسی میان‌کنش ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته از روش طیف نشری فلوروسانس استفاده شد. بدین منظور غلظت معینی از DNA تک رشته به‌طور جداگانه با غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه و پس از اتمام زمان، نمونه‌های کنترل و تیمار شده در طول موج ۲۵۸ نانومتر تهییج و طیف جذبی آن‌ها رسم شد. سپس میزان جذب فلوروسانس نمونه‌های استاندارد دارو در هر غلظت از میزان جذب نمونه‌های تیمار شده با دارو در همان غلظت کسر و نمودار مربوط به DNA تک رشته در محدوده ۵۰۰-۵۵۰ نانومتر رسم شد (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار تغییرات طیف جذبی DNA (A) تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین و پس از برانگیخته شدن در طول موج ۲۵۸ نانومتر. شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین می‌باشند. (B) تغییرات DNA $I_0 - I / I_0 \times 100$ تک رشته بر حسب غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین (D) نمودار اشتراک-ولمر DNA تک رشته.

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در طول موج تهییج ۲۵۸ نانومتر و در غیاب ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین، DNA تک رشته دارای یک قله جذبی در ۵۲۰ نانومتر هستند که مربوط به کروموفورهای DNA (بازهای DNA) است و با افزایش غلظت ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین، میزان جذب کروموفورهای DNA تک رشته افزایش می‌یابد بدون این که در طیف DNA تک رشته جابه‌جایی صورت گیرد.

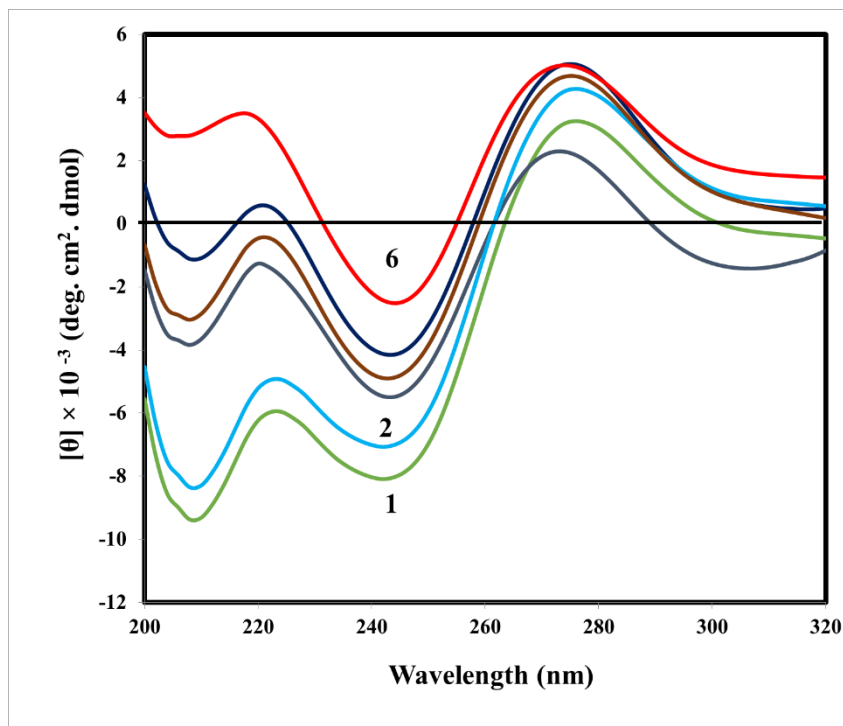
باتوجه به نتایج حاصل از فلورسانس، منحنی $I_0 - I / I_0 \times 100$ مربوط به DNA تک رشته در مقابل غلظت‌های مختلف دارو نیز رسم شد. همان‌طور که در شکل ۳-B نشان داده شده است، I_0 شدت نشر فلورسانس نمونه DNA تک رشته در غیاب ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین و I شدت نشر فلورسانس نمونه DNA تک رشته در حضور غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین است. مشاهده می‌شود که در غلظت پایین ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین (۱۲/۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تمایل دارو برای DNA تک رشته تقریباً کم است و در غلظت‌های بالاتر (۵۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) DNA تک رشته تمایل بیشتری را به ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین نشان می‌دهد. شکل ۳-C نمودار اشتراک-ولمر را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده اثر خاموش‌کنندگی (Quenching) داروی ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین است. شیب این نمودار همان ثابت اشتراک-ولمر است که به صورت مولار بیان می‌شود و مقادیر آن برای DNA تک رشته برابر $1/42 \times 10^3 M^{-1}$ می‌باشد (شکل ۳) که نشان‌دهنده این است که دارو تمایل زیادی به DNA تک رشته دارد. شکل ۴ ثابت اتصال ۳- (H-Tetrazol-5-yl) کومارین به DNA تک رشته‌ای $Ka = 68.359 \times 10^3 M^{-1}$ و تعداد جایگاه اتصال $n = 0.724$ را نشان می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۴. ثابت اتصال Ka و تعداد محل اتصال n در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

به منظور مطالعه تاثیر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین بر ساختار دوم مولکول DNA تک رشته از روش دورنگ‌نمایی حلقوی (CD) در محدوده فرابنفش نزدیک استفاده شد. بدین منظور DNA تک رشته با غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در دمای اتاق و به دور از نوربه مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت زمان معین، طیف CD نمونه‌ها در غیاب DNA تک رشته رسم شد. سپس طیف CD غلظت‌های مختلف دارو در هر غلظت از طیف نمونه‌های تیمار شده با ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین در همان غلظت کسر شد و منحنی مربوطه رسم شد (شکل ۵). همان‌طور که در شکل مشاهده

می‌شود، طیف DNA تک رشته در غیاب ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین دارای دو ناحیه مثبت یکی در ۲۲۰ نانومتر و دیگری در ۲۷۵ نانومتر و یک ناحیه منفی در ۲۴۵ نانومتر می‌باشد. افزایش غلظت ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین، ellipticity مولکول DNA تک رشته در همه نواحی از جمله در ۲۷۵، ۲۴۵ و ۲۲۰ نانومتر را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در ۲۷۵ نانومتر و در حضور دارو ellipticity افزایش یافته و به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر جابه‌جا می‌شود. در ۲۴۵ نانومتر با افزودن بر میزان ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین ellipticity مثبت‌تر شده و نمودار بدون تغییر در طول موج می‌باشد و بالاخره در ۲۲۰ نانومتر علاوه بر افزایش ellipticity، مقداری جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر وجود دارد.



شکل ۵. طیف CD مولکول DNA تک رشته در حضور و غیاب غلظت‌های مختلف ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین.

3- بحث

فعالیت ضدتوموری مشتقات کومارین طبیعی و مصنوعی به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است و ثابت شده است که کومارین‌ها، بسته به ساختارشان، می‌توانند بر روی سلول‌های تومور مختلف توسط مکانیسم عمل مختلف مانند مهار آنزیم تلومراز، مهار فعالیت پروتئین کیناز و کاهش بیان انکوژن عمل می‌کنند هم‌چنین آپوپتوز با واسطه کاسپاز ۹ را القا می‌کنند، و با متوقف کردن چرخه سلولی در فاز G0/G1، فاز G2/M، تکثیر سلول‌های سرطانی را سرکوب می‌کنند (۱۶ و ۱۵).

DNA در هسته سلول‌های یوکاریوت در هنگام همانندسازی برهنه است و ممکن است مورد هدف بسیاری از ترکیبات یا آنزیم‌های مختلف قرار گیرد ولی در حالت معمول برهنه نیست و در اتصال با پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی است که مجموعاً ترکیب نوکلئوپروتئینی به نام کروماتین را ایجاد می‌کند. از طرفی در ساختار کروماتین، DNA حول اکتامر هیستونی پیچیده و نوکلئوزوم را تشکیل می‌دهد. ترکیبات DNA موجود در هسته سلول از مهم‌ترین اهداف بسیاری از داروهای ضدسرطان پس از ورود آن‌ها به درون هسته سلول است و تاکنون مطالعات زیادی در زمینه نحوه اثر داروهای ضدتومور بر روی ساختار کروماتین و DNA صورت گرفته است. در مورد اثر ۳- (تترازول-۵-ایل) کومارین بر روی DNA تک رشته اطلاعاتی در

دست نیست و داده‌های موجود در خصوص ترکیب نام‌برده بر روی ساختار DNA نیز وجود ندارد. به‌همین دلیل تصمیم بر آن شد که اثر این دارو بر DNA تک رشته محلول بررسی و نتایج حاصل از میان‌کنش آن با DNA تک رشته مورد بررسی قرار شد. بدین منظور غلظت ثابتی از DNA تک رشته با غلظت‌های مختلف ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین در دمای اتاق و به‌دور از نور انکوبه و پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، مطالعات مختلف اسپکتروسکوپی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

نتایج به‌دست آمده از افزایش جذب DNA تک رشته در ۲۱۰ و ۲۶۰ نانومتر به‌صورت وابسته به غلظت بوده و نشان‌دهنده مشارکت گروه‌های فسفات و بازهای DNA در میان‌کنش با دارو می‌باشد. در غلظت‌های بالا ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین ساختار DNA تک رشته باز شده و در نتیجه میزان جذب افزایش می‌یابد. شدت افزایش جذب در مورد DNA تک رشته نشان‌دهنده تمایل بیش‌تر دارو برای اتصال به DNA تک رشته است.

اسپکتروسکوپی فلوروسانس نسبت به طیف سنجی جذبی کارآمدتر، حساس‌تر و از پیچیدگی بیش‌تری برخوردار است. با استفاده از روش اسپکتروسکوپی فلوروسانس می‌توان اطلاعات مهمی درباره ساختار ماکرومولکول به‌دست آورد (۱۷-۱۹). افزایش شدت نشر فلورسانس DNA تک رشته نشان‌دهنده باز شدن کروموفورهای DNA در حضور ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین است و نیز خطی بودن منحنی اشترن-ولمر نیز تاییدی بر این حالت است. منحنی $I_0-I/I_0 \times 100$ از DNA تک رشته هم‌چنان نشان‌دهنده تمایل زیاد ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین به DNA تک رشته است. از طرفی باز شدن کروموفورهای DNA تک رشته می‌تواند به اینترکاله شدن ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین به‌درون این ساختارها نسبت داده شود. در مطالعه‌ای که مشتقات کومارینی مانند کومارین ۳۵ ($K_{sv} = 25.61 \times 10^3 M^{-1}$) بر روی آلبومین سرم گاوی (BSA) انجام شد و هم‌چنین در مطالعه دیگری که به بررسی مشتق دیگر کومارین به‌نام ۴-متیل-۷-هیدروکسی کومارین در حضور BSA و HSA پرداخته شد، K_{sv} به‌ترتیب برابر $1/8.0 \times 10^3 M^{-1}$ و $4/97 \times 10^3 M^{-1}$ می‌باشد که به‌این ترتیب ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین ($K_{sv} = 1/42 \times 10^3 M^{-1}$) ثابت معادله اشترن - ولمر کم‌تری نسبت به‌این مشتقات کومارینی دارد (۲۰، ۲۱). در مطالعه دیگری که تاثیر کومارین در حضور اتیدیوم برماید و اکریدین اورنج انجام شد K_{sv} به‌ترتیب برابر $0/21 \times 10^3 M^{-1}$ و $0/56 \times 10^3 M^{-1}$ می‌باشد که از K_{sv} مربوط به ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین کم‌تر می‌باشد (۲۲).

طیف سنجی CD روشی قوی در مطالعه خصوصیات کنفورماسیونی ملکول DNA تک رشته است و در مطالعه میان‌کنش اسیدهای نوکلئیک با پروتئین‌ها و لیگاندها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳-۲۵). تغییر ellipticity مولکول DNA در ناحیه ۲۴۵ نانومتر بیان‌گر تغییر حالت راست‌گردی B-DNA می‌باشد. به‌علاوه میان‌کنش دارو در ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر سبب افزایش ellipticity می‌شود. به‌طور کلی تغییرات در ۲۲۰، ۲۴۵ و ۲۷۵ نانومتر نشان‌دهنده تاثیر دارو بر stacking بازها است که سبب تغییر کنفورماسیون B در ساختار DNA و کاهش ساختارهای دوم مولکول DNA و احتمالاً تغییر B-DNA به A و یا C-DNA می‌شود.

۴- نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج حاصل از میان‌کنش ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین با DNA تک رشته که حاکی از تمایل زیاد دارو برای اتصال به DNA تک رشته می‌باشد، احتمالاً درگیر شدن DNA تک رشته به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین هدف‌های موجود در ساختار کروماتین با ۳- (ترازول-۵-ایل) کومارین می‌باشد.

5- منابع

1. Fitz-James MH, Cavalli G. Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nature Reviews Genetics*. 2022;1-17.
2. Detilleux D, Spill YG, Balaramane D, Weber M, et al. Pan-cancer predictions of transcription factors mediating aberrant DNA methylation. *Epigenetics & Chromatin*. 2022;15(1):1-16.
3. Disatham J, Brennan L, Jiao X, Ma Z, et al. Changes in DNA methylation hallmark alterations in chromatin accessibility and gene expression for eye lens differentiation. *Epigenetics & Chromatin*. 2022;15(1):1-27.
4. Esfahani SN, Damavandi MS, Sadeghi P, Nazifi Z, et al. Synthesis of some novel coumarin isoxazol sulfonamide hybrid compounds, 3D-QSAR studies, and antibacterial evaluation. *Scientific reports*. 2021;11(1):1-15.
5. Medina FG, Marrero JG, Macas-Alonso M, González MC, et al. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. *Natural product reports*. 2015;32(10):1472-507.
6. Yue Q, Shen T, Wang C, Gao C, et al. Study on the interaction of bovine serum albumin with ceftriaxone and the inhibition effect of zinc (II). *International Journal of Spectroscopy*. 2012;2012.
7. Mostajeran N, Arshad FA, Aliyan H, Massah AR. Solvent-free synthesis and antibacterial evaluation of novel coumarin sulfonamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(1):1-7.
8. Naik CG, Malik GM, Parekh HM. Novel coumarin derivatives: synthesis, characterization and antimicrobial activity. *South African Journal of Chemistry*. 2019;72:248-52.
9. Wexler RR, Greenlee WJ, Irvin JD, Goldberg MR, et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the next generation in antihypertensive therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996; 39(3):625-56.
10. Heravi MM, Khaghaninejad S, Mostofi M. Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives. *Advances in heterocyclic chemistry*. Elsevier. 2014; 112: 1-50.
11. Schmidt B, Drexler H, Schieffer B. Therapeutic Effects of Angiotensin (AT 1) Receptor Antagonists. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2004;4(6):361-8.
12. Tisseh ZN, Dabiri M, Bazgir A. An Efficient Synthesis of 3-(1H-Tetrazol-5-yl)coumarins (=3 (1H-Tetrazol-5-yl)-2H-1-benzopyran-2-ones) via Domino Knoevenagel Condensation, Pinner Reaction, and 1,3-Dipolar Cycloaddition in Water. *Helvetica Chimica Acta*. 2012;95(9):1600-4.
13. Medina FG, Marrero JG, Macas-Alonso M, González MC, et al. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. *Natural product reports*. 2015;32(10):1472- 507.
14. Gentili PL, Ortica F, Favaro G. Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(51):16793-801.
15. Zhou F-W, Lei H-S, Fan L, Jiang L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin-fluoroquinolone conjugates as a novel type of potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24(8):1912-7.
16. Tripathi VK, Singh J, Ara T, Koul S, et al. Synthesis and biological evaluation of novel isoxazoles and triazoles linked 6-hydroxycoumarin as potent cytotoxic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014;24(17):4243-6.
17. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy, p 443-475. Springer Science, New York, NY; 2009.
18. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy: Springer science & business media; 2013.
19. Kelly SM, TJ Jess i NC Price. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751:119-39.
20. Bayraktutan T, Onganer Y. Biophysical influence of coumarin 35 on bovine serum albumin: Spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017;171:90-6.
21. Sharma K, Yadav P, Sharma B, Pandey M, et al. Interaction of coumarin triazole analogs to serum albumins: Spectroscopic analysis and molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition*. 2020;33(6):e2834.
22. Sarwar T, Rehman SU, Husain MA, Ishqi HM, et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: deciphering the mode of binding by in vitro studies. *International journal of biological macromolecules*. 2015;73:9-16.

23. Lazniewska J, Agostino M, Hickey SM, Parkinson-Lawrence ET, et al. Spectroscopic and molecular docking study of the interaction between neutral Re (I) tetrazolate complexes and bovine serum albumin. *Chemistry*. 2021; 27(44):11406-11417.
24. Freifelder D. *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology*; by David Freifelder. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 2nd Edition, 1982, pp. 624.
25. Li D, Zhu M, Xu C, Ji B. Characterization of the baicalein-bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;46(2):588-99.