JARC

علمی-پژوهشی

برهم‌کنش کمپلکس پادتومور روی حاوی لیگاند شیف باز با آلبومین سرم انسانی و گاوی

سمیه شهرکی[۱و*] و فاطمه خسروی[۲]

۱. دانشیار شیمی معدنی، گروه شیمی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲. دکتری شیمی معدنی، گروه شیمی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت: آذر ۱۴۰۰ بازنگری: فروردین ۱۴۰۱ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

10.30495/JACR.2022.1946470.1997 20.1001.1.17359937.1401.16.2.5.9

چکیده

در این پژوهش برهم‌کنش کمپلکس روی $[Zn(SBL)_2]Cl_2$ (SBL = لیگاند شیف باز ۲(-ایمینواتیل)پیپرازین‌دی‌استیل‌مونواکسیم) با پروتئین آلبومین سرم انسانی (HSA) و گاوی (BSA) در محیط تریس بافر حاوی ۰/۱ میلی‌مولار سدیم کلرید در سه دمای ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلوین با روش‌های طیف‌سنجی مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های به‌دست‌آمده برای هر دو کمپلکس به‌تقریب مشابه بودند، به‌طوری‌که طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که خاموش‌سازی فلورسانس ذاتی هر دو پروتئین به‌دلیل برهم‌کنش کمپلکس روی از راه سازوکار خاموش‌سازی ایستا است. کمپلکس روی با تمایلی به‌تقریب مشابه، $K_b = \sim 10^4\ M^{-1}$، با هر دو پروتئین برهم‌کنش کرد. عامل‌های ترمودینامیکی مشارکت پیوند هیدروژن و برهم‌کنش‌های واندروالس را نشان داد، ولی نقش برهم‌کنش‌های آب‌گریزی به‌دلیل حضور گروه ایمین در ساختار کمپلکس و مقدار کوچک ΔS بی‌اهمیت نیست. تغییرهای ساختاری طی برهم‌کنش کمپلکس روی با دو پرروتئین مورد مطالعه با روش‌های فلورسانس هم‌زمان و سه بعدی و همچنین، دورنگ نمایی حلقوی موردبررسی قرار گرفت. نتیجه‌های فلورسانس همزمان نشان داد که در حین برهم‌کنش کمپلکس با HSA و BSA تغییر قطبیت محسوسی در اطراف باقی‌مانده تریپتوفان رخ نمی‌دهد در حالی که در اطراف باقی‌مانده تیروزین قطبیت تغییر می‌کند. بررسی طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی نیز کاهش محتوای مارپیچ آلفا در ساختار هر دو پروتئین را نشان می‌دهد. نتیجه‌های این پژوهش تایید می‌کند که برهم‌کنش کمپلکس روی در هر دو پروتئین به‌تقریب مشابه است. بنابراین، گاهی می‌توان در مطالعه‌های دارویی به جای پروتئین انسانی از هم خانواده حیوانی آن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: برهم‌کنش‌های پروتئین، عام‌های پیوندی/ ترمودینامیکی، تغییرهای ساختاری، سرم آلبومین انسانی/گاوی، کمپلکس‌های شیف باز

مقدمه

تهیه کمپلکس‌های فلزی با لیگاندهای متفاوتی که ویژگی‌های زیستی دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته است. لیگاندهای شیف باز یک گروه عمده از ترکیب‌های آلی هستند که دارای ویژگی‌های زیستی بسیاری مانند فعالیت‌های پادباکتری، پادقارچ، پادمالاریا، پادالتهابی،

* عهده‌دار مکاتبات: s-shahraki@uoz.ac.ir
& somaye_shahraki@yahoo.com

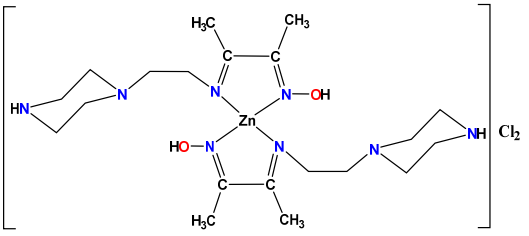
پادویروسی و تب‌بر هستند [۱ تا ۴]. شیف بازها ترکیب‌های حاوی گروه ایمینی (–R = CN–) هستند که از تراکم آمین نوع اول با کربنیل فعال (RCOR') تهیه می‌شوند [۵]. در بیشتر شیف بازها اتم‌های دهنده بیشتر گروه‌های NO یا N_2O_2 هستند و در برخی نیز O می‌تواند با N و S یا Se جایگزین شود [۶]. به‌نظر می‌رسد که در این ترکیب‌ها، گروه عاملی –C = N– نقشی پایه‌ای در توسعه ویژگی‌های زیستی، مانند فعالیت پاداکسیدانی دارد. در سال‌های اخیر، بسیاری از کمپلکس‌های فلزی شیف باز به‌عنوان جاذب برای گونه‌های حاوی اکسیژن فعال استفاده شده‌اند و ویژگی پاداکسیدانی قابل‌توجهی دارند [۷ و ۸]. برای مثال، لیگاند متقارن ۶،۲–دی(فنازونیل–۴–ایمینو)متیل)–۴–متیل فنل و کمپلکس‌های تک هسته‌ای روی و دو هسته‌ای کبالت آن، فعالیت پاداکسیدانی قابل‌توجهی در برابر رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل دارند [۹]. لی و همکارانش تهیه لیگاند شیف باز نارینجنین–۲–هیدروکسی‌بنزوئیل‌هیدرازون و کمپلکس‌های آن را گزارش کردند. آن‌ها قدرت پاداکسیدانی این ترکیب‌ها در برابر رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید را در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی کردند. لیگاند تهیه‌شده و کمپلکس‌های آن قدرت پاداکسیدانی قابل‌توجهی نشان دادند و از پاداکسیدان‌های استاندارد مانند ویتامین C و مانیتول نیز عملکرد بهتری داشت [۱۰]. تهیه لیگاند شیف باز، هسپرتین–۲–هیدروکسی بنزوئیل‌هیدرازون و برخی از کمپلکس‌های فلزی آن توسط لی و همکارانش گزارش شد. آن‌ها از روش‌های مهار رادیکال‌های ($O_2^{\bullet-}$) و ($HO^{\bullet}$) برای ارزیابی قدرت پاداکسیدانی در ترکیب‌های تهیه‌شده استفاده کردند. نتیجه‌های آن‌ها نشان داد که کمپلکس‌های تهیه‌شده در مقایسه با لیگاند آزاد و حتی برخی از پاداکسیدان‌های استاندارد، ظرفیت پاداکسیدانی بالاتری دارند [۱۱].

آلبومین سرم انسانی (HSA[1]) پروتئینی کروی با ۵۸۵ اسیدآمینه، جزء اصلی‌ترین و درعین حال فراوانترین پروتئین‌های موجود در پلاسمای خون است. این پروتئین مسئول حدود ۸۰ درصد از فشار اسمزی خون است [۱۲ و ۱۳]. این پروتئین با داشتن سه جایگاه پیوند اختصاصی (I، II، III) که هر کدام از آن‌ها دو زیر ناحیه A و B دارند، نقش مهمی درانتقال و پخش داروها در خون دارد [۱۴ و ۱۵]. پیوند دارو با آلبومین خون و تغییر ساختار پروتئین، یکی از عامل‌های بروز عوارض جانبی دارو هستند. از این‌رو، بر هم‌کنش تعداد زیادی از داروها با این پروتئین مطالعه شده است [۱۶ و ۱۷]. به طورمعمول منابع آلبومین مورداستفاده شامل سرم آلبومین انسانی، اوالبومین[2] تخم مرغ و آلبومین سرم شیر گاو است. آلبومین سرم گاوی دارای وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک ۴٫۷ در آب °C ۲۵، فراوان و در دسترس است، خالص‌سازی این ترکیب ساده و دارای ویژگی پیوندی مشابه هم‌خانواده انسانی خود (یعنی HSA) با لیگاندهاست. آلبومین نقش‌های زیستی مهمی در بدن دارد و یک پروتئین چند عملکردی است. از نظر ساختاری بسیار انعطاف‌پذیر است ولی به سادگی دچار اختلال ساختاری شدید نمی‌شود. این پروتئین، حامل بسیاری از ترکیب‌های گوناگون مانند بیلی‌روبین، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، هورمون‌ها، داروها، پادزیست‌ها، ترکیب‌های حلقوی باردار و کوچک و بسیاری از کاتیون‌های فلزی است [۱۸]. مطالعه‌ها رابطه بین میزان فعالیت و تغییرهای ساختاری پروتئین‌ها را به اثبات رسانده است. مطالعه تغییرهای ساختار (ساختار ثانویه) پروتئین‌ها با طیف‌سنجی مرئی–فرابنفش، فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی[3] صورت می‌پذیرد [۱۹].

در این پژوهش، یک کمپلکس روی(II) با لیگاند شیف باز ۲(–ایمینواتیل)پیپرازین‌دی‌استیل‌مونواکسیم (شکل ۱) که

1. Human serum albumin (HAS)
2. Ovalbumin
3. Circular dichroism (CD)

ویژگی‌های پادتوموری آن علیه رده‌های سلولی HT-116 گزارش شده است [۱]، انتخاب و برهم‌کنش آن با پروتئین آلبومین سرم انسانی و گاوی، HSA و BSA[1]، با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفت. شیوه‌های پیوندی این کمپلکس با این دو پروتئین و همچنین، عامل‌های پیوندی و ترمودینامیکی و همچنین، تغییرهای ساختاری این پروتئین به کمک طیف‌سنجی مرئی فرابنفش، فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی بررسی شدند.



شکل ۱ ساختار مولکولی کمپلکس شیف باز تهیه‌شده

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

حلال‌های مورداستفاده پیش از مصرف، با روش‌های استاندارد تقطیر شدند. واکنشگرهای استیل‌مونواکسیم، ۲-آمینواتیل‌پیپرازین، روی (II) کلرید، سدیم کلرید و آلبومین سرم انسانی و گاوی و تریس(هیدروکسی‌متیل)آمینومتان از شرکت آلدریچ خریداری شدند. طیف‌های الکترونی در ناحیه مرئی و فرابنفش، با استفاده از طیف‌سنج JASCO UV/Vis-7850 ثبت شد. برای بررسی نشر فلورسانس، طیف‌نورسنج فلورسانس Agilent Cary Eclipse به‌کارگرفته شد. طیف‌های CD با طیف‌قطبش‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی[2] Jasco J-810 ثبت شد.

کمپلکس شیف باز با روش گزارش‌شده تهیه شد [۱]. نتیجه‌های تجزیه عنصری محاسبه‌شده برای $C_{20}H_{40}N_8O_2Cl_2Zn$ (M.W: 596.6)؛ کربن، ۴۰٫۲۳؛ هیدروژن، ۶٫۷۰؛ نیتروژن، ۱۸٫۷۷ درصد و نتیجه‌های به‌دست‌آمده برای این ترکیب؛ کربن، ۴۰٫۱۰؛ هیدروژن، ۶٫۴۹؛ نیتروژن، ۱۸٫۶۳ درصد بودند. در طیف FTIR (قرص KBr) نوارهای cm^{-1} ۳۳۱۹ مربوط به ارتعاش کششی گروه OH اکسیم، cm^{-1} ۱۴۸۳ مربوط به ارتعاش کششی گروه C=N اکسیم، cm^{-1} ۱۶۳۶ مربوط به ارتعاش کششی گروه ایمینی شیف باز و cm^{-1} ۴۵۷ مربوط به ارتعاش‌های پیوند فلزی Zn-N هستند. طیف ^{1}HNMR کمپلکس در میدان ۲۵۰ مگاهرتز و حلال DMSO-d6 ثبت شد. نوار پهن یکتایی در ppm ۱۱٫۴۵ به هیدروژن گروه اکسیم (-C=N-OH) نسبت داده می‌شود. سایر نشانک‌ها که در گستره ۱٫۷۸ الی ppm ۴٫۲۱ پدیدار شده‌اند مربوط به دو گروه متیل بخش اکسیمی (1.78-2.46 ppm, 6H) و پروتون‌های پیپرازین (2.88-4.21 ppm, 12H) هستند. در مقایسه با لیگاند آزاد همه پروتون‌های کمپلکس جابه‌جایی شیمیایی قابل‌توجهی نشان می‌دهند که تاییدکننده کئوردیناسیون لیگاند شیف باز به مرکز فلزی است. در طیف الکترونی کمپلکس، سه نوار در ۲۲۸، ۲۸۳ و ۳۱۹ نانومتر پدیدار شدند. دو نوار اول به انتقال‌های الکترونی $\pi\rightarrow\pi^*$ و $n\rightarrow\pi^*$ گروه C=N آزومتین و نوار سوم به انتقال‌های بار فلز به لیگاند نسبت داده می‌شود [۱].

مطالعه برهم‌کنش کمپلکس روی با HSA و BSA

برهم‌کنش کمپلکس روی و دو پروتئین حامل HSA و BSA در محیط تریس بافر حاوی ۱۰ میلی‌مولار سدیم کلرید با pH برابر با ۷٫۴ بررسی شد. محلول مادر کمپلکس روی با غلظت 3×10^{-3} مولار با حل‌کردن در آب دوبار تقطیرشده، تهیه شد. محلول مناسب هریک از دو پروتئین نیز با حل‌کردن آن در بافر تریس کار تهیه شد.

1. Bovine serum albumin (BSA)

2. Circular dichroism spectropolarimeter

طیف‌سنجی UV-Vis

طیف‌های جذبی محلول پروتئین–کمپلکس با طیف‌سنج مرئی–فرابنفش در گستره طول موج ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شدند. در این بررسی غلظت هر پروتئین ۵ میکرومولار و غلظت کمپلکس در گستره ۲٫۷ تا ۵۴٫۳ میکرومولار بود.

طیف‌سنجی فلورسانس

طیف‌سنجی فلورسانس یکی از روش‌های مؤثر در تشخیص سازوکار خاموش‌سازی، روش و قدرت برهم‌کنش بین پروتئین و کمپلکس تهیه‌شده است [۲۰]. بنابراین، اندازه‌گیری نشر فلورسانس در گستره طول موج ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر انجام شد. طیف‌های فلورسانس در سه دمای متفاوت ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلوین ثبت شدند. طیف‌های فلورسانس پروتئین تنها با غلظت ثابت (۳٫۲ میکرومولار برای HSA و ۳٫۰ میکرومولار برای BSA) و در غلظت‌های متفاوتی از کمپلکس روی (۰ تا ۶۰ میکرومولار) در طول موج تهییجی ۲۸۰ نانومتر و بیشینه طول موج نشر ۳۳۷ نانومتر ثبت شدند.

خاموش‌سازی فلورسانس می‌تواند با دو سازوکار متفاوت ایستا[1] و پویا روی دهد. خاموش‌سازی ایستا به دلیل تشکیل کمپلکس حالت پایه بین فلوروفور و خاموش‌کننده است و خاموش‌سازی پویا نتیجه برخورد بین فلوروفور و خاموش-کننده است [۲۱]. برای بررسی خاموش‌سازی ایجاد شده با کمپلکس، معادله استرن–ولمر ۱ به‌کارگرفته شد [۲۲].

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \qquad (۱)$$

در این معادله، F_0 و F به ترتیب شدت‌های فلورسانس در غیاب و حضور خاموش‌کننده و k_q ثابت سرعت خاموش‌سازی فلوروفور–پروتئین، K_{SV} ثابت سرعت خاموش‌سازی استرن–ولمر، τ_0 مدت زمان عمر پروتئین بدون خاموش‌کننده و $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده است که میزان در دسترس قرار گرفتن فلوروفورها در برابر خاموش‌کننده وابسته به اندازه و بار آن است. در فرایند خاموش‌سازی تنها بخشی از برخوردها با خاموش‌کننده موثر هستند، پس ثابت سرعت خاموشی باید به‌صورت تجربی تعیین شود. با توجه به معادله $K_{SV} = k_q \tau_0$ زمان عمر فلورسانس تریپتوفان در هر دو پروتئین حدود $۱۰^{-۸}$ ثانیه است. ثابت سرعت خاموش‌سازی کمپلکس–پروتئین را می‌توان بر پایه معادله بالا برآورد کرد. با استفاده از خاموش‌سازی فلورسانس می‌توان عامل‌های دیگر مانند مقادیر ثابت پیوند (K) و تعداد محل‌های پیوند لیگاند به درشت‌مولکول (n) را به‌دست آورد (معادله ۲).

$$log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K + n \log [Q] \qquad (۲)$$

ازآن‌جایی که در برهم‌کنش لیگاند (پروتئین، دارو، فلزات و غیره) با پروتئین نیروهای متفاوتی مانند نیروهای واندروالس، برهم‌کنش آبگریز، برهم‌کنش الکتروستاتیک و پیوندهای هیدروژنی شرکت دارند؛ بنابراین، در پیوند لیگاند به پروتئین یک انتقال انرژی روی می‌دهد که خاموشی فلورسانس نیز نتیجه این انتقال انرژی است. این نوع خاموشی که در اثر انتقال انرژی یک مولکول به مولکول دیگر ایجاد می‌شود به انتقال انرژی رزونانس فلورسانس[2] معروف است [۲۳]. برپایه نظریه انتقال انرژی غیر تشعشعی سرعت این انتقال انرژی به عامل‌های زیر وابسته است:

۱. نسبت جهت‌یابی دو قطبی‌های دهنده (پروتئین) و گیرنده (کمپلکس روی)

۲. اندازه هم‌پوشانی طیف نشری فلورسانس دهنده (پروتئین) با طیف جذبی گیرنده (کمپلکس روی)

۳. فاصله بین دهنده و گیرنده

انتقال انرژی فقط به فاصله بین پروتئین و لیگاند محدود نمی‌شود بلکه فاصله انتقال انرژی بحرانی (R_0) نیز در این

1. Static

2. Fluorescence Resonance Energy Transfter (FRET)

انتقال موثر است. عامل‌های مربوط به این انتقال انرژی با معادله‌های ۳ تا ۶ زیر به‌دست می‌آیند.

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (۳)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (۴)$$

$$J = \frac{\int F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 \, \Delta\lambda}{\int F(\lambda) \, \Delta\lambda} \quad (۵)$$

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (۶)$$

در این معادله‌ها F_0 و F به ترتیب شدت‌های فلورسانس پروتئین در غیاب و حضور خاموش‌کننده، r فاصله بین پروتئین و لیگاند، R_0 فاصله بحرانی (فاصله فورستر)، K^2 عامل جهت‌یابی فضایی دو قطبی پروتئین و لیگاند، n متوسط توان انکساری محیط در ناحیه موجی که طیف‌ها همپوشانی دارند و برابر ۱/۳۳ است، Φ بهره کوانتومی پروتئین و J اثر همپوشانی طیفی بین طیف نشری پروتئین و طیف جذبی لیگاند است [۲۴].

طیف‌سنجی فلورسانس هم‌زمان

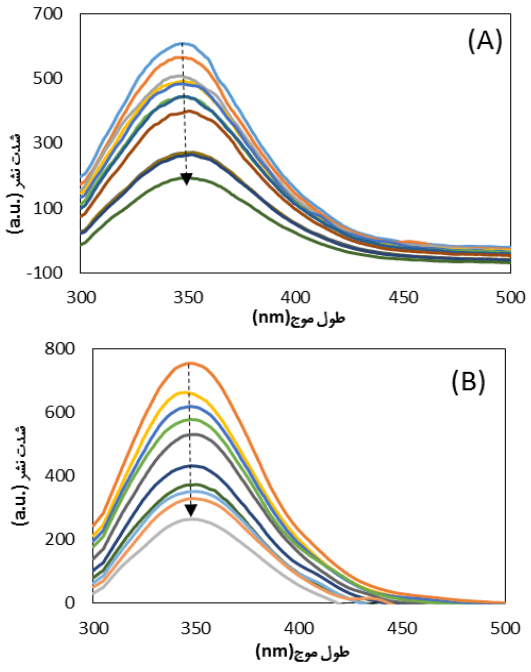
برهم‌کنش پروتئین با مولکول‌های موجود در محیط اطراف آن، برای مثال کمپلکس‌ها، موجب ایجاد تغییر جزئی صورت‌بندی و تغییر قطبیت می‌شود که برای بررسی نوع برهم‌کنش اهمیت دارد. برای این اندازه‌گیری تفاوت بین طول موج تحریک و نشر ($\Delta\lambda$) بر روی ۱۵ نانومتر (برای تیروزین) و ۶۰ نانومتر (برای تریپتوفان) تنظیم شد. هر دو شکاف نوار تحریک و نشر نیز در ۵ نانومتر ثابت شدند.

دورنگ نمایی دورانی (CD)

با این آزمایش تغییرساختارهای دوم پروتئین در غیاب و در حضور کمپلکس روی در دمای محیط بررسی شد. غلظت پروتئین موردنیاز برای این مطالعه ۳ میکرومولار بود و تغییر در ساختار پروتئین در اثر برهم‌کنش غلظت مشابهی از کمپلکس (۳ میکرومولار) پس از سه دقیقه قرارگفتن در گرمخانه، بررسی شد. همچنین طیف‌های بافر تنها و کمپلکس بدون پروتئین نیز به‌عنوان نمونه‌های شاهد ثبت شدند.

نتیجه‌ها و بحث

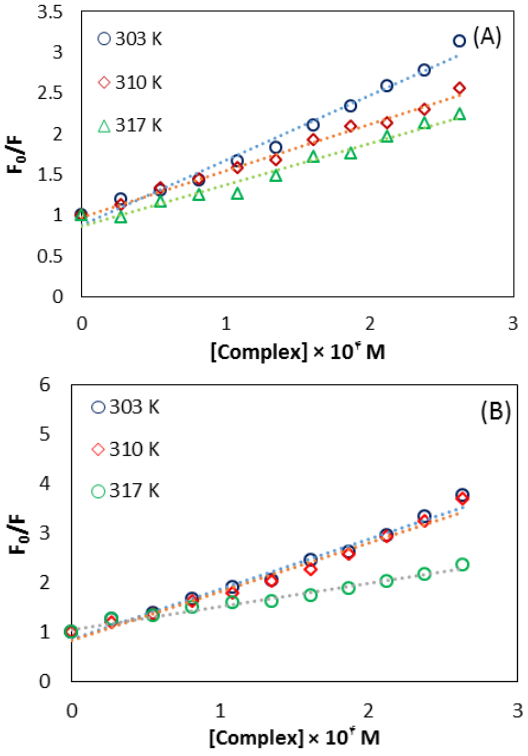
شکل ۲ طیف‌های فلورسانس دو پروتئین HSA و BSA را با افزودن غلظت‌های متفاوت کمپلکس روی در دمای ۳۰۳ کلوین در طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر نشان می‌دهد (طیف‌های مربوط به دو دمای دیگر نمایش داده نشده است).



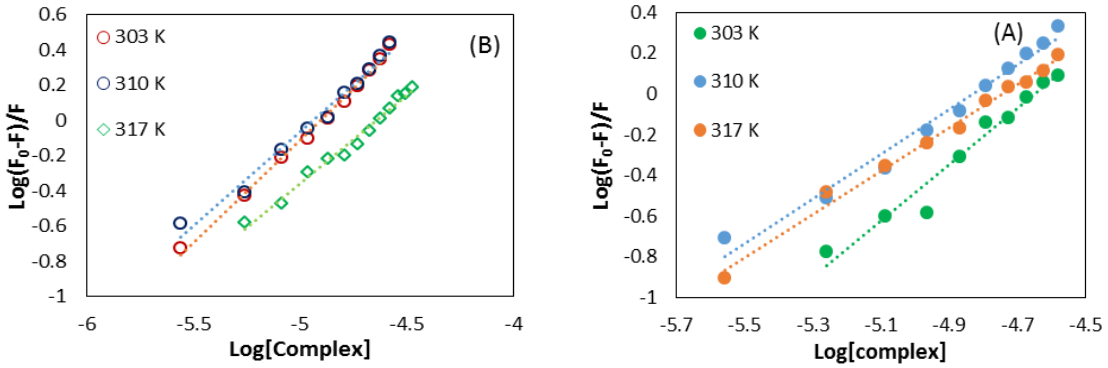
شکل ۲ طیف‌های نشر فلورسانس پروتئین HSA (۳/۲ میکرومولار) (A) و پروتئین BSA (۳/۰ میکرومولار) (B) در حضور غلظت‌های متفاوتی از کمپلکس روی (۰ تا ۶۰ میکرومولار) برای HSA و (۰ تا ۶۴ میکرومولار) برای BSA در ۳۰۳ کلوین

با توجه به این شکل، با افزایش غلظت کمپلکس روی شدت نشر برای هر دو پروتئین کاهش می‌یابد که این‌امر نشان‌دهنده برهم‌کنش این ترکیب با این دو پروتئین است.

شکل ۳ نمودارهای F_0/F بر حسب غلظت کمپلکس روی را در دماهای متفاوت نشان می‌دهد. مقادیر K_{SV} (ثابت خاموش‌سازی استرن-ولمر) و k_q (ثابت سرعت خاموش‌سازی) در دماهای متفاوت برای دو سامانه کمپلکس روی–پروتئین محاسبه شد که در جدول ۱ نمایش داده شده است. با توجه به مقادیر K_{SV} در جدول ۱ سازوکار خاموش‌سازی HSA و BSA با کمپلکس روی از نوع ایستا است، زیرا مقادیر K_{SV} با افزایش دما کاهش می‌یابند. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود مقادیر ($K_{SV} = k_q \tau_0$) k_q برای این ترکیب از عدد S^- $^1M^{-1}$ ۲ ×۱۰^{۱۰} (این عدد بیشینه ثابت سرعت خاموش‌سازی به طریق برخورد نفوذی یعنی تشکیل حالت گذار فلوروفور–خاموش‌سازی با درشت مولکول‌های زیستی‌است) بزرگ‌تر است که ایستا بودن سازوکار خاموش‌سازی با کمپلکس تهیه‌شده را نشان می‌دهد. نتیجه‌های مشابهی توسط هو و همکارانش برای کمپلکس $[Cu(L_1)(NO_3)_2]$ گزارش شده است که L_1 شیف باز مشتق‌شده از کینولین ((E)–متیل–۴–((کینولین–۸–ایل–متیلن) آمینو) بنزوات)) است [۲۵]. شکل ۴ نمودارهای log $(F_0 - F)/F$ بر حسب log [Complex] را در دماهای متفاوت برای سامانه کمپلکس روی–HSA و کمپلکس روی–BSA و جدول ۱ مقادیر K_b و n محاسبه‌شده در دماهای متفاوت را برای این سامانه‌ها نشان می‌دهند. مقدار n برای این دو سامانه به‌طور تقریبی نزدیک به یک است. با افزایش دما، مقادیر K_b کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده خاموش‌سازی ایستا است. این نتیجه‌ها مشابه نتیجه‌های K_{SV} است. این نتیجه‌ها با گزارش‌های سونگ و همکارانش همخوانی دارد [۲۶]. چنین روندی در بسیاری از کمپلکس‌های شیف باز مشاهده شده است که در آن‌ها خاموش‌سازی نشر فلورسانس پروتئین با سازوکار ایستا پیش رفته است [۸، ۲۶ تا ۳۱]. نیروهای ایجادشده بین مولکول‌های کوچکی مانند داروها و درشت‌مولکول‌ها مانند پروتئین‌ها به‌طور عمده شامل پیوندهای هیدروژنی، واندروالس، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و آب‌گریز است [۳۲ و ۳۳]. با محاسبه عامل‌های ترمودینامیکی برهم‌کنش دارو با پروتئین می‌توان نوع این برهم‌کنش‌ها را پیش‌بینی کرد. محاسبه این عامل‌ها (ΔH، ΔS و ΔG) با کمک معادله وانت‌هوف و رسم‌نومدار Ln K نسبت به $1/T$ امکان پذیر است. شکل ۵ نمودار وانت‌هوف برای دو سامانه موردمطالعه و جدول ۱ مقادیر ΔH، ΔS و ΔG محاسبه‌شده را نشان می‌دهند.



شکل ۳ نمودارهای استرن– ولمر برای برهم‌کنش HSA (A) و BSA (B) با کمپلکس روی (II) در سه دمای ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلوین



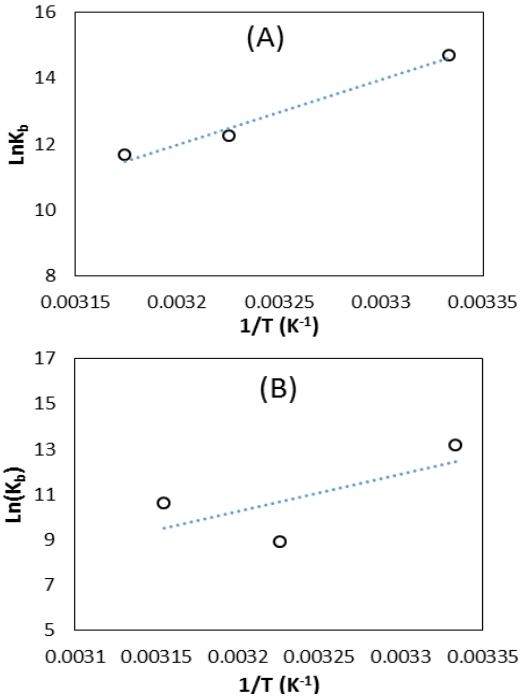
شکل ۴ نمودارهای $(F_0\text{-}F)/F$ log برحسب log [Complex] در دماهای متفاوت برای کمپلکس روی–HSA (A) و کمپلکس روی–BSA (B)

جدول ۱ ثابت‌های پیوندی و ترمودینامیکی در برهم‌کنش کمپلکس روی با HSA و BSA در دماهای متفاوت

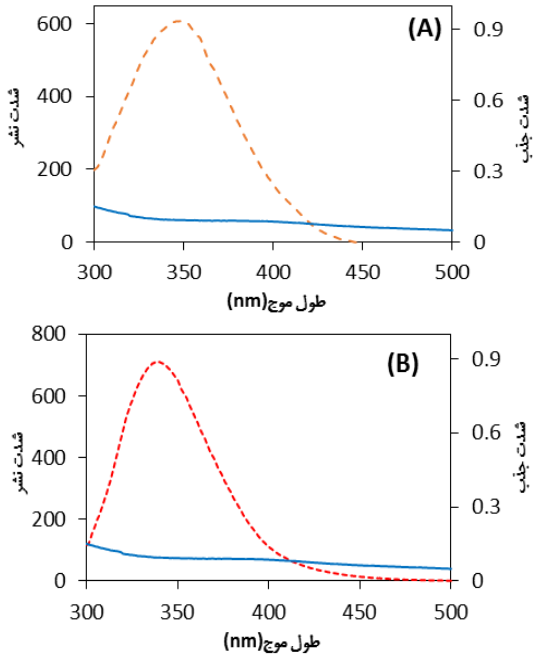
پروتئین	T (K)	n	K_b ($\times10^5$ M^{-1})	k_q ($\times10^{12}$ $M^{-1}S^{-1}$)	K_{SV} ($\times10^4$ M^{-1})	ΔS° (J mol^{-1} K^{-1})	ΔH° (kJ mol^{-1})	ΔG° (kJ mol^{-1})
HSA	۳۰۳	۱٫۱۲	۷٫۵۸	۱٫۱۰	۱٫۱۰	-۰٫۶۶	-۲۴٫۷۳	-۴۰٫۵۳
	۳۱۰	۱٫۱۰	۲٫۵۱	۰٫۸۴	۰٫۸۴			-۳۵٫۸۵
	۳۱۷	۱٫۰۳	۰٫۷۹	۰٫۷۱	۰٫۷۱			-۳۱٫۱۸
BSA	۳۰۳	۱٫۳۷	۲٫۳۹	۰٫۸۰	۰٫۸۰	-۰٫۴۲	-۱۶۵٫۰۰	-۳۶٫۰
	۳۱۰	۱٫۱۰	۲٫۰۴	۰٫۵۷	۰٫۵۷			-۳۳٫۳
	۳۱۷	۱٫۰۶	۱٫۱۴	۰٫۵۱	۰٫۵۱			-۳۰٫۲

برپایه انرژی آزاد گیبس، مقادیر منفی انرژی آزاد نشان‌دهنده این است که پیوند میان کمپلکس روی با هر دوپروتئین فرایندی خودبه‌خودی است. مقادیر منفی آنتالپی و آنتروپی، وجود پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های واندروالسی در برهم‌کنش کمپلکس روی با این دو پروتئین حامل را تأیید می‌کند [۳۴]. البته با توجه به مقدار کوچک آنتروپی و همچنین، وجود گروه ایمین در ساختار کمپلکس، وجود برهم‌کنش‌های آب‌گریز نیز دور از انتظار نیست. مشابه این برهم‌کنش‌ها در پیوند بسیاری از داروها و همچنین،کمپلکس‌های فلزی با پروتئین‌های HSA و BSA گزارش شده است [۸، ۲۷ و ۲۸].

نظریه FRET اشاره به انتقال انرژی غیرتابشی از یک مولکول دهنده (پروتئین) به مولکول گیرنده (کمپلکس روی) دارد. با توجه به این نظریه فاصله بین دهنده و پذیرنده قابل محاسبه است. هم‌پوشانی طیف نشری پروتئین با طیف جذبی کمپلکس برای محاسبه فاصله بین پروتئین حامل و کمپلکس روی به‌کار می‌رود. شکل ۶ هم‌پوشانی طیف‌های فلورسانس این دو پروتئین با طیف الکترونی کمپلکس روی و جدول ۲ مقادیر E و r محاسبه‌شده برای این ترکیب را نشان می‌دهد.



شکل ۵ نمودارهای وانت هوف در دماهای متفاوت برای برهم‌کنش HSA (A) و BSA (B) با کمپلکس روی



شکل ۶ هم‌پوشانی طیف‌های فلورسانس پروتئین (نقطه چین) و کمپلکس روی (خط ممتد) در دمای ۳۰۳ کلوین و با نسبت کمپلکس به پروتئین ۱:۱ و غلظتی برابر ۳ میکرومولار برای HSA (A) و BSA (B)

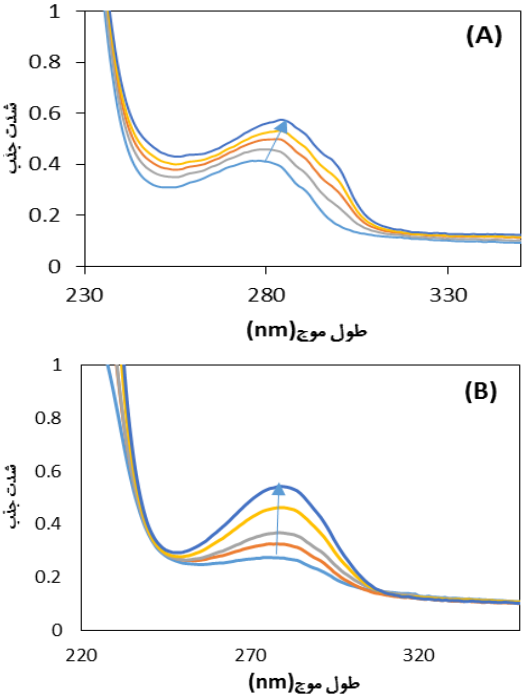
جدول ۲ مقدارهای E و r محاسبه‌شده برای برهم‌کنش کمپلکس روی و دو پروتئین HSA و BSA

سامانه	J (cm^3 L mol^{-1})	E	R_0 (nm)	r (nm)	$0.5R_0 < r < 1.5R_0$
HSA-Zn Complex	۵٫۸۸ × ۱۰$^{-۱۳}$	۰٫۲۸۰	۴٫۹۰	۵٫۸۲	۲٫۴۹ < ۵٫۸۲ < ۷٫۴۶
BSA-Zn Comple	۳٫۳۴ × ۱۰$^{-۱۳}$	۰٫۳۲۰	۴٫۵۲	۵٫۲۹	۲٫۲۶ < ۵٫۲۹ < ۶٫۷۹

مطالعه‌ها نشان می‌دهند اگر فاصله بین یک دارو و پروتئین کمتر از ۸ nm باشد ($r < 8$ nm) باشد، انتقال انرژی بین دارو و پروتئین با احتمال بالایی انجام می‌شود [۳۵ و ۳۶]. با توجه به مقادیر r در جدول ۲ انتقال انرژی بین کمپلکس روی و هر دو پروتئین با احتمال بسیار بالایی انجام می‌شود. نتیجه‌های مشابهی در گزارش‌های دهخدایی و همکارانش مشاهده می‌شود [۳۷].

جذب پروتئین در طول موج بیشینه ۲۸۰ nm مبنای بررسی و تفسیر برهم‌کنش‌ها درنظرگرفته شد. شکل ۷ طیف جذبی UV-Vis مربوط به دو پروتئین HSA و BSA در حضور و غیاب کمپلکس روی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت کمپلکس شدت طیف جذبی افزایش می‌یابد که این پدیده بیانگر برهم‌کنش کمپلکس با HSA و BSA است (شکل ۷). همان‌طور که مشاهده می‌شود طول موج بیشینه با افزایش غلظت

کمپلکس روی به طرف طول موج‌های بلندتر جابه‌جا شده است. این جابه‌جایی می‌تواند دلیلی بر تغییر قطبیت در اطراف آمینواسیدهایی باشد که قادر به جذب نور مرئی هستند.



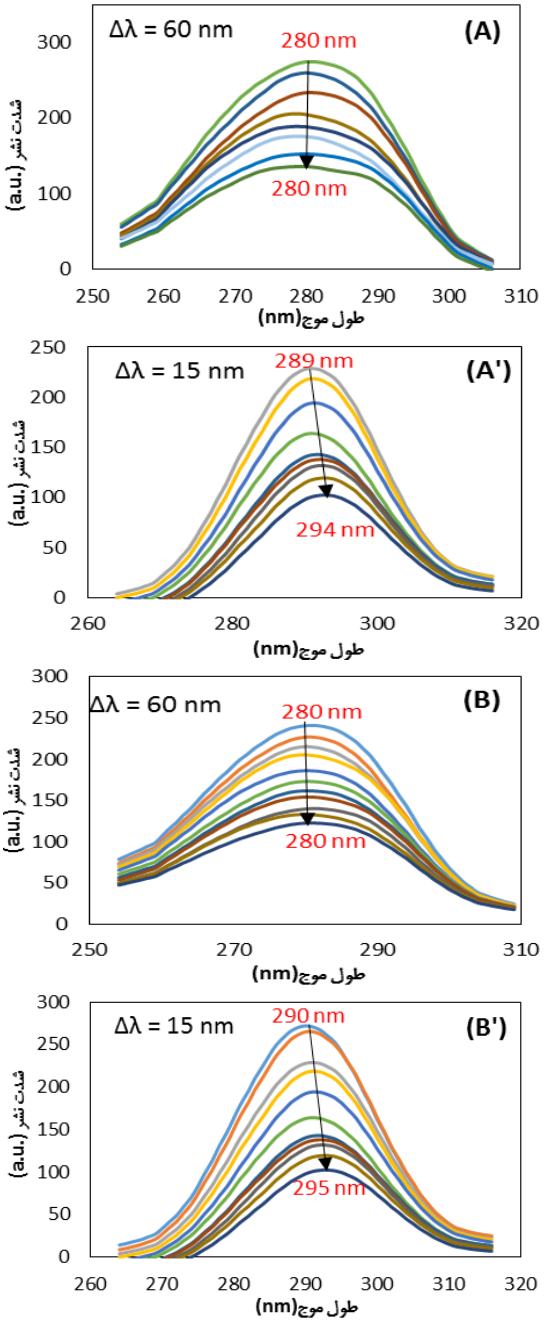
شکل ۷ طیف‌های الکترونی مربوط به پروتئین HSA (A) و پروتئین BSA (B) (۵ میکرومولار) در حضور غلظت‌های متفاوت از کمپلکس روی (۲٫۷ تا ۵۴٫۳ میکرومولار)

طیف‌سنجی فلورسانس هم‌زمان که یک روش ساده و مفید است به‌طور گسترده‌ای برای مطالعه محیط مولکولی مجاور مولکول فلورفور و ارزیابی تغییرهای صورت‌بندی پروتئین استفاده می‌شود. تفاوت بین طول‌موج تحریک و طول موج نشر ($\Delta\lambda$) یک عامل مفید برای بررسی مشخصات فلورسانس هم‌زمان HSA است. مقدارهای $\Delta\lambda$ برابر با ۱۵ و ۶۰ به‌ترتیب برای توصیف باقی‌مانده‌های تیروزین و تریپتوفان مناسب است [۳۸]. مولکول برهم‌کنش‌دهنده می‌تواند فلورسانس ذاتی پروتئین را با انتقال و یا بدون هیچ‌گونه انتقال در بیشینه طیف نشری (λ_{max}) خاموش کند. اگر مولکول برهم‌کنش‌کننده موجب خاموشی فلورسانس پروتئین بدون هیچ‌گونه جابه‌جایی در بیشینه طیف نشری شود، آب‌گریزی و قطبیت در محیط اطراف مولکول فلوروفور (تریپتوفان یا تیروزین) تغییر نمی‌کند. جابه‌جایی آبی در بیشینه طیف نشری نشان‌دهنده این است که کاهش قطبیت یا افزایش آب‌گریزی در اطراف مولکول فلوروفور اتفاق افتاده است و از سوی دیگر جابه‌جایی قرمز نشان می‌دهد که افزایش قطبیت یا کاهش آب‌گریزی در محیط اطراف مولکول فلوروفور رخ داده است.

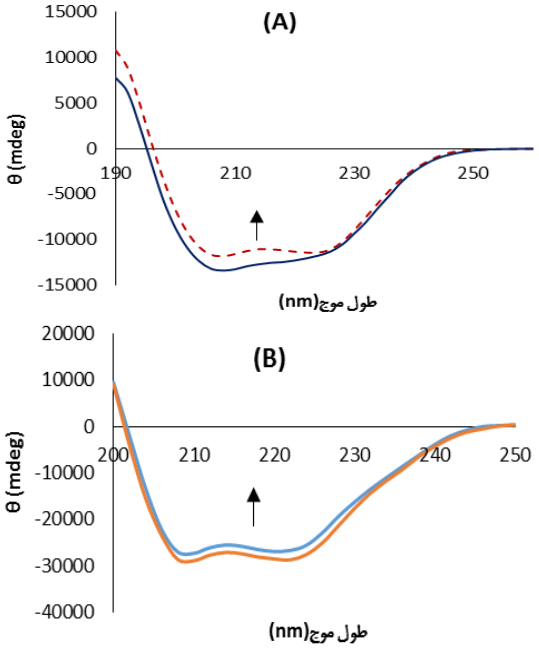
طیف‌های فلورسانس هم‌زمان در غلظت‌های متفاوت کمپلکس در شکل ۸ نشان داده شده است. با افزایش غلظت کمپلکس کاهش شدت نشر فلورسانس در همه نمودارها قابل مشاهده است. همان‌طور که دیده می‌شود برای هر دو پروتئین در مورد $\Delta\lambda$ برابر با ۶۰، جابه‌جایی قرمز یا آبی در بیشینه طیف مشاهده نمی‌شود در حالی که برای $\Delta\lambda$ برابر با ۱۵، جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر (از ۲۸۹ نانومتر به ۲۹۴ نانومتر برای HSA و از ۲۹۰ نانومتر به ۲۹۵ نانومتر برای BSA) یا جابه‌جایی قرمز در بیشینه طیف مشاهده می‌شود. برپایه مطالب ذکرشده در بالا نبود جابه‌جایی در بیشینه طیف نشری (λ_{max}) بیانگر این است که پس از برهم‌کنش کمپلکس با این دو پروتئین هیچ گونه تغییری در قطبیت اطراف باقی‌مانده تریپتوفان رخ نداده است و یا این تغییر به قدری کوچک بوده است که به صورت جابه‌جایی در طیف‌ها قابل‌مشاهده نیست، در حالی‌که جابه‌جایی قرمز در $\Delta\lambda$ برابر با ۱۵ نشانگر افزایش قطبیت در اطراف باقی‌مانده تیروزین پروتئین است. این مشاهده تایید می‌کند که انتخاب طول موج برانگیختگی در آزمایش‌های نشر فلورسانس در ۲۸۰ نانومتر (برانگیخته‌شدن تیروزین و تریپتوفان) درست بوده است.

تقارن ساختاری موجود در یک درشت‌مولکول زیستی ویژه مانند پروتئین منجر به ایجاد تفاوت در جذب نور قطبیده چپ‌گردان در مقابل راست‌گردان می‌شود که اندازه‌گیری این تفاوت با طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی انجام می‌گیرد. طیف دو رنگ نمایی دورانی HSA و BSA با حضور یک نوار در ۲۰۸ و یک نوار در ۲۲۲ نانومتر مشخص می‌شود که نشان‌دهنده پیچ خوردگی پروتئین است (شکل ۹) [۳۹].

طیف‌های CD مربوط به پروتئین تنها و در حضور کمپلکس روی در شکل ۹ نشان داده شده‌اند. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که درصد مارپیچ آلفا پروتئین در نبود کمپلکس روی ۴۷/۴ ٪ برای HSA و ۵۱/۴۴ ٪ برای BSA است که این مقادیر در حضور کمپلکس به ۴۴/۳ ٪ برای HSA و ۴۵/۹۳ ٪ برای BSA کاهش یافته است. کاهش محتوای مارپیچ آلفا نشان‌دهنده این است که کمپلکس با اسیدآمینه‌های زنجیره پلی‌پپتیدی HSA پیوند برقرار کرده و موجب تخریب ساختار پیوند هیدروژنی آن شده است. همچنین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کمپلکس با ایجاد تغییر ساختاری محدود در پروتئین می‌تواند موجب کاهش پایداری پروتئین شود. با مقایسه عددهای به‌دست‌آمده می‌توان گفت که تغییرهای ساختاری پروتئین BSA نسبت به HSA در حضور کمپلکس روی کمی بیشتر است و این تفاوت محدود با تفاوت اندکی که در قدرت برهم‌کنش این دو پروتئین نیز مشاهده شد، به‌طورکامل همخوانی دارد. این نتیجه‌ها با گزارش‌های ارایه شده توسط جینگ و همکارانش همخوانی دارد [۴۰].



شکل ۸ طیف‌های فلورسانس هم‌زمان برای پروتئین HSA (A و A') و پروتئین BSA (B و B') در حضور غلظت‌های متفاوتی از کمپلکس روی وقتی Δλ برابر با ۱۵ و ۶۰ نانومتر است.



شکل ۹ طیف‌های CD مربوط به پروتئین‌های HSA (A) و BSA (B) (۳ میکرومولار) در نبود و در حضور کمپلکس روی (۳ میکرومولار)

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، کمپلکس محلول در آب روی به فرمول کلی $[Zn(SBL)_2]Cl_2$ (SBL = لیگاند شیف باز ۲ (-ایمینواتیل)پیپرازین‌دی‌استیل‌مونواکسیم) انتخاب و برهم‌کنش آن با دو پروتئین حامل HSA و BSA در تریس بافر حاوی سدیم کلرید (۱۰ میلی‌مولار) و pH برابر با ۷/۴ در سه دمای ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلوین مطالعه شد. طیف‌سنجی فلورسانس وجود برهم‌کنش‌های واندروالس و هیدروژنی بین پروتئین‌ها و کمپلکس را تایید کرد و نشان داد که این کمپلکس می‌تواند نشر فلورسانس آن‌ها را به کمک سازوکار ایستا خاموش کند. با مقایسه نتیجه‌ها می‌توان گفت که قدرت این کمپلکس در گستره قدرت ترکیب‌های دارویی که به مرحله بالینی رسیده اند قرار دارد (10^{-6}–10^{-4} M^{-1})؛ این موضوع بسیار مهم در طراحی داروهای نوترکیب است، زیرا قدرت پیوند باید آنقدر قوی باشد که پیوند دارو با پروتئین حامل تا زمان رسیدن به اندام هدف حفظ شود و از طرفی نباید خیلی قوی باشد که منجر به تغییر ساختار و عملکرد پروتئین حامل شده و نتواند از آن به راحتی جدا شود. مطالعه تغییرهای ساختاری در پروتئین، کاهش مقدار مارپیچ آلفا را نشان داد، اگرچه تغییرها خیلی زیاد نبود، ولی تغییرهای ساختاری پروتئین BSA نسبت به HSA در حضور کمپلکس روی کمی بیشتر بود و این نتیجه با تمایل به‌نسبت بیشتر BSA به کمپلکس روی در مقایسه با HSA همخوانی نشان داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه زابل برای حمایت‌های مالی در مسیر انجام پژوهش سپاسگزارند.

مراجع

[1] Shahraki, S.; Saeidifar, M.; Delarami, H. S. and Kazemzadeh, H. J. Mol. Struct. 1205, 127590, 2020.
[2] Mermer, A.; Demirbas, N.; Uslu, H.; Demirbas, A.; Ceylan, S.; Sirin, Y.; J. Mol. Struct. 1181, 412-422, 2019.
[3] Rahim, F.; Ullah, H.; Taha, M.; Wadood, A.; Javed, M.T.; Rehman, W., Nawaz, M.; Ashraf, M.; Ali, M.; Sajid, M.; Ali, F.; Naseem Khan, M. and Mohammed Khan, K. Bioorg. Chem. 68, 30-40, 2016.
[4] Mesbah, M.; Douadi, T.; Sahli, F.; Issaadi, S.; Boukazoula, S.; Chafaa, S.; J. Mol. Struct. 1151, 41-48, 2018.

[5] Al Zoubi, W.; Al-Hamdani, A A.S.; Kaseem, M.; Appl. Organomet. Chem. 30, 810-817, 2016.
[6] Garnovskii, A.D.; Nivorozhkin, A.L.; Minkin, V.I.: Coord. Chem. Rev. 126, 1-69, 1993.
[7] Kostova, I.; Saso, L.; Curr. Med. Chem. 20, 4609-4632, 2013.
[8] Shahraki, S.; Majd, M.H.; Heydari, A.; J. Mol. Struct. 1177, 536-544, 2019.
[9] Liu, H.; Shi, X.; Xu, M.; Li, Z.; Huang, L.; Bai, D.; Zeng, Z.; Eur. J. Med. Chem. 46, 1638-1647, 2011.
[10] Li, T.-R.; Yang, Z.-Y.; Wang, B.-D .Chem. Pharm. Bull. 55, 26-28, 2007.
[11] Li, Y.; Yang, Z.-Y.; Wang, M.-F.; J. Fluoresc. 20, 891-905, 2010.
[12] Ascenzi, P.; Fasano, M.; Biophys. Chem. 148, 16-22, 2010.
[13] Li, Y.; He, W.; Liu, H.; Yao, X.; Hu, Z.; J. Mol. Struct. 831, 144-150, 2007.
[14] Carter, D.C.; Ho, J.X.; Adv. Protein Chem. 45, 153-203, 1994.
[15] Curry, S.; Brick, P.; Franks, N.P.; BBA Molecular and Cell Biology of Lipids. 1441, 131-140, 1999.
[16] Shiri, F.; Shahraki, S.; Bazzi-Alahri, M.; J. Mol. Struct. 1221, 128809, 2020.
[17] Shahraki, S.; Saeidifar, M.; Shiri, F.; Heidari, A.; Polycyclic Aromat. Compd. 39, 220-237, 2019.
[18] Holford, J.; Beale, P.; Boxall, F.; Sharp, S.; Kelland, L; Eur. J. Cancer 36, 1984-1990, 2000.
[19] Kantoury, M ;.Eslami Moghadam, M.; Tarlani, A.A.; Divsalar, A.; Chem. Biol. Drug Des. 88, 76-87, 2016.
[20] Mansouri-Torshizi, H.; Khosravi, F.; Ghahghaei, A.; Shahraki, S.; Zareian-Jahromi, S.; J. Biomol. Struct. Dyn. 36, 2713-2737, 2018.
[21] Wu, D.; Wang, J.; Liu, D.; Zhang, Y.; Hu, X.; Scientific Reports 9, 1-8, 2019.
[22] Eftink, M.R.; Ghiron, C.A.; Anal. Biochem. 114, 199-227, 1981.
[23] Shen, X.; Yang, X.; Zhang, X.; Jie Cui, Z.; Kricka, L.J.; Stanley, P.E.; "Bioluminescence and Chemiluminescence: Light Emission: Biology and Scientific Applications", World Scientific, China, 2009.
[24] Kazemi, Z.; Rudbari, H.A.; Sahihi, M.; Mirkhani, V.; Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.; Mohammadpoor-Baltork, I.; Azimi, G.; Gharaghani, S.; Abbasi Kajani, A.; J. Photochem. Photobiol., B. 162, 448-462, 2016.
[25] Hu, K.; Liu, C.; Li, J. and Liang, F. MedChemComm. 9, 1663-1672, 2018.
[26] Song, X.-Q.; Wang, Z.-G.; Wang, Y.; Huang, Y.-Y.; Sun, Y.-X.; Ouyang, Y., Xie, C.-Z.; Xu, J.-Y.; J. Biomol. Struct. Dyn. 38, 733-743, 2020.
[27] He, C.; Majd, M.H.; Shiri, F.; Shahraki, S.; J. Mol. Struct. 1229, 129806, 2021.
[28] Gurusamy, S.; Krishnaveni, K.; Sankarganesh, M.; Nandini Asha, R.; Mathavan, A.; J. Mol. Liq. 345, 117045, 2022.
[29] Hashemnia, S.; Fard, F.K.; Mokhtari, Z.J.; Mol. Liq. 348, 118058, 2022.
[30] Shi, J.-H..; Pan, D.-Q.; Jiang, M.; Liu, T.-T., Wang, Q.; J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 164, 103-111, 2016.
[31] Asadizadeh, S., Amirnasr, M.; Tirani, F.F.; Mansouri, A.; Schenk, K.; Inorg. Chim. Acta. 483, 310-320, 2018.
[32] Ross, P.D.; Subramanian, S.; Biochemistry 20, 3096-3102, 1981.
[33] Yang, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Yang, H.; International Conference on Medicine Sciences and Bioengineering (ICMSB2016, BIO Web of Conferences 8, 01021, 2017), Guangdong, China, October 15-16, 2016.
[34] Naik, P.N.; Nandibewoor, S.T.; Chimatadar, S.A.; J. Pharm. Anal. 5, 143-152, 2015.
[35] Khan, S.N.; Islam, B.; Rajeswari, M.; Usmani, H.; Khan, A.U.; Acta Biochim. Pol. 55, 399-409, 2008.
[36] Shiri, F.; Shahraki, S.; Baneshi, S.; Nejati-Yazdinejad, M.; Majd, M.H.; RSC Adv. 6, 106516-106526, 2016.

[37] Dehkhodaei, M.; Sahihi, M.; Rudbari, H.A.; Momenbeik, F.; J. Biol. Inorg. Chem. 23, 181-192, 2018.
[38] Zhang, J.; Gao, X.; Huang, J.; Wang, H.; ACS Omega. 5, 16833-16840, 2020.
[39] Wang, K.; Lu, J.; Li, R.; Coord. Chem. Rev. 151, 53-88, 1996.
[40] Jing, J.; Qu, X.; Tu, Z.; Zheng, C.; Zheng, Z.; Mol. Med. Rep. 9, 2191-2196, 2014.

JARC

Study of interaction between the anti-tumor complex of zinc(II) containing Schiff base ligand with human and bovine serum albumin

Somaye Shahraki [1,*], Fatemeh Khosravi[2]

1. Associate Prof. of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Ph.D of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Zabol, Zabol, Iran.

Abstract: Due to the growing interest of researchers in the synthesis of new chemical compounds that have diverse medicinal properties, in this study, the interaction of the complex of $[Zn(SBL)_2]Cl_2$ (SBL = Schiff base ligand 2(-iminoethyl)piperazine diacetyl monoxime) with human and bovine serum albumin proteins (HSA and BSA) in tris-buffer medium was investigated by spectroscopic methods. The results for both complexes were almost identical, as fluorescence spectroscopy showed that the inherent fluorescence quenching of both proteins is due to the interaction of the zinc complex through a static quenching mechanism. The zinc complex interacted with both proteins with almost the same affinity. Thermodynamic parameters showed the contribution of hydrogen bonding and van der Waals interactions, but the role of hydrophobic interactions is not insignificant due to the presence of the imine group in the complex structure and the small amount of ΔS. Structural changes during the interaction of zinc complex with two proteins were investigated by synchronous fluorescence methods as well as circular dichroism. The results of synchronous fluorescence showed that during the interaction of the complex with proteins no noticeable polarity change occurred around the tryptophan residue while around the tyrosine residue the polarity changed. The study of circular dichroism spectroscopy also shows a decrease in the content of the alpha helix in both complexes. The results of this study confirm that the interaction of the zinc complex in both proteins is almost similar, so sometimes in pharmacological studies it can be used instead of human protein from its animal family.

Keywords: Binding/thermodynamic parameters; Human/Bovine serum albumin; Protein interactions; Schiff base complexes; Structural changes

*** Corresponding author Email:** s-shahraki@uoz.ac.ir & somaye_shahraki@yahoo.com