

تهیه و شناسایی نانوذرات نقره عامل دار شده با ۴-بنزن سولفونامید تیوفنل و بررسی پیوند آن با دی اکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) به روش های متفاوت طیف نورسنجی

فرشته امیری^۱، مرضیه صادقی^{۲*} و طاهره شگری^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، مرکز خوی، ایران

۲. استادیار شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

دریافت: اسفند ۹۸ بازنگری: مهر ۹۹ پذیرش: مهر ۹۹

چکیده: نانوذرات نقره عامل دار شده با ۴-بنزن سولفونامید تیوفنل (BSATP-AgNPs) تهیه و تشکیل نانوذرات BSATP-AgNPs با روش های طیفسنجی فرسوخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف های رزونانس مغناطیسی (H NMR)، میکروسکوپی عبوری الکترونی (TEM) و طیف نورسنجی UV-Vis شناسایی شد. برهم کنش نانوذرات با دی اکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) با روش های طیف نورسنجی UV-Vis، طیفسنجی فلورسانس، طیفسنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)، اندازه گیری گران روی و داکینگ مولکولی بررسی شد. داده های طیفی دورنگ نمایی دورانی نشان داد که پیوند نانوذرات با DNA منجر به تغییر در ساختار DNA می شود که نشان دهنده حالت پیوند شیار جزئی است. در فلورسانس نانوذرات BSATP-AgNPs در حضور مقادیر متفاوت DNA کاهش شدت مشاهده شد. عامل های ترمودینامیکی نشان داد که پیوند یونی نقش اصلی را در پیوند نانوذرات به DNA دارند. مطالعه های داکینگ مولکولی نیز حاکی از وجود شیار جزئی پیوند است. با توجه به نتایج و داده های آزمایشی، برهم کنش قابل توجهی بین نانوذرات BSATP-AgNPs با HSA و BSA مشاهده شد. نتایج داده های CD نشان داد که صورت بندی مولکول های HSA و BSA به طور قابل توجهی در حضور نانوذرات BSATP-AgNPs تغییر می کند. مقادیر ΔH^0 منفی و ΔS^0 مثبت نشان داد که برهم کنش عمده بین نانوذرات و HSA پیوندهای هیدروژنی و نیروهای ضعیف و اندروالس است. افزون بر این، با توجه به داده های ترمودینامیکی (آنتالپی منفی و تغییرات آنتروپی مثبت)، آبگریزی نقش پایه ای در پیوند نانوذرات به BSA ایفا کرده است. نتایج آزمایش های رقابتی نشان دهنده های جایگاه پیوند تایید کرد که نانوذرات BSATP-AgNPs به سرم آلبومین انسانی در مکان I زیر گروه IIA و به BSA در مکان II پیوند شده است.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره عامل دار شده با BSATP، DNA، سرم آلبومین انسانی، سرم آلبومین گاوی، مطالعات

اسپکتروسکوپی، داکینگ مولکولی

مقدمه

بالا، سمیت بالا، عوارض جانبی و پیدایش مقاومت دارویی محدود شده است. با وجود پیشرفت تشخیص زودرس و درمان، کشف درمان‌های جایگزین، ابزار و دارو برای وضعیت مطلوب ضروری است. توسعه نانوذرات دارویی برای تحویل دارو به شدت مورد مطالعه قرار گرفته است که شامل تولید، پایداری، فرمولاسیون و دارورسانی است [۳ و ۴]. در میان نانومواد متنوع، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌های بی‌همتا مانند رسانایی، کاتالیستی، پادباکتریایی، زیست‌سازگار بودن با شرایط محیط بدن و تهیه آسان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. نقره و فرآورده‌های نقره با توجه به فعالیت پادمیکروبی برای طیف گسترده‌ای از ریزاندامگان^۱ ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و به تازگی ویروس‌ها به کار گرفته شده‌اند [۵].

امروزه نانوذرات فلزهای نجیب و از آن میان نانوذرات نقره در زمینه‌های دارویی و پادسرطانی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۶ تا ۱۰]. گروه‌های بنزن سولفونامیدها، گستره وسیعی از ویژگی‌های زیستی و دارویی را دارند. این داروها در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی و انگلی (مانند مالاریا) کاربرد دارند و سازوکار اثر آن‌ها مهار سنتز اسیدنوکلئیک است. سولفونامیدها با مهار رقابتی آنزیم دی‌هیدروپتروآت سنتتاز (DHPS^۲) موجب توقف رشد سلول می‌شوند [۱۱ و ۱۲]. در این پژوهش تلاش شد با قراردادن این گروه بر نانوذره‌های نقره و با توجه به ویژگی ذکر شده این نانوذره‌ها، ترکیبی با ویژگی پادتوموری ساخته شود.

برهم‌کنش نانوذره‌های نقره با بازهای DNA با روش‌های طیف‌سنجی رزونانس پلاسمون سطحی (SPRS^۳) و پراکندگی ارتقاء یافته سطحی رامان (SERS) توسط باسو و همکارانش بررسی شد [۹]. در پژوهش آن‌ها تجمع نانوذره‌ها در اثر برهم‌کنش با بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین موجب

برهم‌کنش مولکول‌های کوچک با DNA (دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید) در سال‌های اخیر مورد توجه بسیار زیادی قرار گرفته است، چرا که این برهم‌کنش‌ها می‌تواند پایه بسیاری از فرایندهای داخل سلولی باشد و موجب شود که تغییرات در رونویسی و همانند سازی DNA قابل پیش‌بینی باشد. از این پیش‌بینی‌ها می‌توان در بررسی مرگ سلولی، تکثیر سلولی، جهش‌های ژنی، علل ایجاد سرطان و درمان آن استفاده کرد. ترکیب‌های پیوندشونده به DNA می‌توانند طیف گسترده‌ای از اثرات نهانی پادسرطان، پادویروس یا سرطان‌زایی را داشته باشند. از بررسی انواع برهم‌کنش‌های ترکیب‌ها با DNA می‌توان در طراحی داروهایی با کارایی بیشتر، مطالعه تغییرات ساختار DNA در اثر واکنش با ترکیب‌های متفاوت و حتی در مطالعه ساختارهای پروتئین - نوکلئیک اسید استفاده کرد.

بیشتر داروهای موجود افزون بر سلول‌های بافت هدف به سلول‌های سالم بدن نیز آسیب‌های زیادی وارد می‌کنند. این اثرات جانبی موجب محدودیت استفاده از این داروها می‌شود و اثربخشی آن‌ها در مهار بیماری را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. امروزه با پیدایش مقاومت‌های دارویی و عوارض جانبی شدید، داروهای شیمی‌درمانی متفاوت سرطان به‌عنوان تهدیدی برای زندگی و عامل مهمی برای مرگ‌ومیر در سراسر جهان تبدیل شده است [۱]. از این‌رو، نیاز فوری به توسعه روش‌های درمانی برای تشخیص زودهنگام و درمان سرطان با کمترین عوارض جانبی احساس می‌شود. در این راستا، پژوهش‌های اخیر به توسعه متنوع نانومواد، دستگاه‌ها و عوامل درمانی برای تشخیص زودهنگام و درمان سرطان منجر شده است [۲ و ۳]. امروزه، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی موجود مانند دوکسوروبیسین، دانوروبیسین، بلئومایسین، و سیس پلاتین با ویژگی‌های ضعیف، هزینه

1. Microorganism
2. Dihydropteroate synthase (DHPS)
3. Surface plasmon resonance spectroscopy (SPRS)

آلبومین انسانی و گاوی و همچنین، ارایه پژوهش‌های بیشتر در مورد رفتار دارویی BSATP-AgNPs فراهم می‌کند.

مواد و دستگاه‌ها

همه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان و دزوکسی ریبو نوکلئیک اسید تیموس گوساله (ct-DNA) از شرکت سیگما آلدریج خریداری شدند. همه محلول‌ها با آب دو بار تقطیر تهیه شدند. طیف ارتعاشی فرسرخ تبدیل فوریه FTIR از نانوذرات BSATP-AgNPs در ناحیه ۴۰۰ تا 4000 cm^{-1} با طیف‌سنج بروکر و با قرص پتاسیم برمید گرفته شد. طیف‌های رزونانس مغناطیسی ($^1\text{H NMR}$) با دستگاه NMR مدل بروکر Avance DRX-500 MHz استاندارد داخلی تترامتیل‌سیلان گرفته شد. ریخت‌شناسی و تعیین اندازه نانوذره‌های نقره در این پژوهش با میکروسکوپ عبوری الکترونی (XL 30, Philips TEM) هلند انجام شد. طیف‌های فرابنفش-مرئی با طیف‌نورسنج فرابنفش-مرئی مدل اجیلنت HP 8453 ثبت شد. طیف‌های فلورسانس با دستگاه جاسکو مدل JASCO FP 6200 و طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی با دستگاه جاسکو مدل JASCO J-810 گرفته و گران‌روی با گران‌روی‌سنج مدل SCHOT-AVS 450 اندازه‌گیری شد. تنظیم pH با بافر هپس و با pH متر مدل JENWAY 3345 انجام شد.

تهیه نانوذره‌های نقره عامل‌دار شده با ۴-بنزنسولفونامیدتیوفنل (BSATP-AgNPs)

در ابتدا آمینوتیوفنل برپایه روش گزارش شده آماده شد [۱۳]. به یک بالن ته‌گرد ۲۵۰ میلی‌لیتری محلول نقره نیترات (۶/۰ میلی‌مول، ۱/۰ گرم) در آب (۲۰ میلی‌لیتر) و متانول (۱۰ میلی‌لیتر) افزوده شد. مواد فوق در حمام یخ (۲۷۴ کلوین) قرار گرفت و با همزن مخلوط شد. سپس ۴-آمینوتیوفنل (۲ میلی‌مول، ۳/۰ گرم) حل شده در متانول (۱۰ میلی‌لیتر) به آرامی به آن افزوده شد و

تجمع نانوذره‌ها و تغییر در طیف آن‌ها شد. در مطالعه دیگری برهم‌کنش نانوذره نقره در حضور ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم برمید (NanoAg-CTMAB) و کاربردهای تجزیه‌ای آن مورد بررسی قرار گرفت [۱۰]. در کار آن‌ها از نانوذره‌های نقره با ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم برمید به عنوان پروب برای اندازه‌گیری غلظت نوکلئیک اسیدها در DNA اسپرم ماهی (fsDNA)، تیموس گوساله (ct-DNA) و مخمر (yRNA) در مقادیر کمتر از نانوگرم بر لیتر استفاده شد. این مطالعه نشان داد که کمپلکس NanoAg-CTMAB قادر به ایجاد تغییرهای ساختاری و همچنین، تغییر در مقدار پیچش DNA است. نقش نانوذرات طلا و نقره به‌عنوان نانودارو در پژوهش‌های سرطان توسط چونگ و همکارانش بررسی شد [۷]. آن‌ها عملکرد نانوذره‌های طلا و نقره در درمان‌های سرطان با داروهای مرسوم در این زمینه را مقایسه و مشخص کردند که نانوداروهای یادشده عوارض نامطلوب جانبی داروهای مرسوم سرطان را ندارند. در این کار انواع روش‌های تهیه، مشخصه‌یابی و سازوکارهای تهیه این نانوذره‌ها بررسی شد.

در این گزارش، تهیه و بررسی ویژگی نانوذره‌ها نقره عامل‌دار شده با ۴-بنزنسولفونامیدتیوفنل و همچنین، برهم‌کنش آن‌ها با DNA تیموس گوساله (ct-DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) با روش‌های متفاوت مانند طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی، طیف‌سنجی فلورسانس، طیف دورنگ‌نمایی دورانی (^1CD)، اندازه‌گیری گران‌روی و داکینگ مولکولی ابزاری انجام شد. تا به حال برهم‌کنش بین این نوع از نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با ct-DNA و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) صورت نگرفته است. نتایج تجربی با نتایج به‌دست آمده از مطالعه داکینگ مولکولی سازگاری داشت. این پژوهش بینش مهمی از برهم‌کنش BSATP-AgNPs با DNA و سرم

کلوین در یخچال نگهداری شد. برای اندازه‌گیری غلظت ct-DNA از روش طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی استفاده شد. در این روش جذب محلول ct-DNA در طول موج بیشینه جذب مربوط در ۲۶۰ نانومتر ($\epsilon_{DNA} = 6600$) اندازه‌گیری و با قانون بیر تعیین غلظت شد. برای اطمینان از خلوص DNA و عدم حضور پروتئین‌ها، جذب محلول در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نسبت جذب در این دو طول موج ۱/۹ به‌دست آمد. برای تهیه محلول‌های آلبومین انسانی و آلبومین گاوی به غلظت $10^{-4} \times 3$ مولار، ۰/۰۴۹۵ گرم از HSA و BSA با ۹۶٪ خلوص به‌صورت پودر لیوفیلیز شده با وزن مولکولی ۶۷۰۰۰ دالتون در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده، حل شد. این محلول در دمای ۲۷۴ کلوین در یخچال و به دور از نور نگهداری شد و به‌طور روزانه مورد استفاده قرار می‌گرفت.

اندازه‌گیری‌های جذب و فلورسانس

در یک سل کوآرتز با طول مسیر یک سانتی‌متر غلظت‌های متفاوتی از ct-DNA به محلولی با غلظت $10^{-5} \times 5$ مولار از BSATP-AgNPs افزوده شد و در دمای ۲۹۸ کلوین و در ناحیه ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر طیف‌های جذبی فرابنفش ثبت شد. طیف‌های جذبی محلول‌های $10^{-4} \times 3$ مولار از HSA و BSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت نانوذره‌های نقره در یک سل کوآرتز با طول مسیر یک سانتی‌متر در دمای ۲۹۸ کلوین و در ناحیه ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شد. طول موج بیشینه (λ_{max}) سرم آلبومین ۲۸۰ و نانوذره ۴۱۰ نانومتر بود.

در ثبت طیف‌های فلورسانس نانوذره‌های نقره پهنای شکاف مونوکروماتور برانگیختگی ۵ نانومتر و مونوکروماتور نشر ۱۰ نانومتر انتخاب شد و در درون سل کوآرتز با طول مسیر ۱ سانتی‌متر با شدت میانگین آشکارساز ثبت شد. اندازه‌گیری‌های فلورسانس با طیف‌سنج فلورسانس JASCO FP6200 با ثابت نگه‌داشتن غلظت BSATP-AgNPs در گستره غلظت DNA از 10^{-4} تا $4/0 \times 10^{-4}$ مولار انجام شد.

محلول زرد رنگ شفاف به‌دست آمد. سپس، محلول تازه‌ای از سدیم بورهیدرید (NaBH_4) (۳ میلی‌مول، ۰/۱ گرم) در ۵ میلی‌لیتر آب آماده شد. سدیم بورهیدرید آب‌دوست در مدت بیش از ۵ ثانیه به محلول سرد افزوده و به مخلوط اجازه‌داده شد به‌تدریج (حدود ۱۸ ساعت) به دمای اتاق برسد. به مخلوط به‌دست آمده ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و سپس مخلوط در دمای ۲۷۴ کلوین به‌مدت ۲۴ ساعت درون ظرفی ثابت نگه‌داشته شد. پس از این مدت محلول بالای نانوذره‌ها با پیپت خارج و ۲۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به آن افزوده شد. این عمل سه بار تکرار شد تا حلال تعویض شود. عدم حضور ۴-آمینوتیوفنل آزاد در محلول نانوذره‌ها با طیف FTIR تایید شد. مخلوط به‌دست آمده پس از فراصوت‌دهی، در حمام یخ (۲۷۴ کلوین) قرار گرفت و با همزن مخلوط هم‌زده شد. سپس، سدیم هیدروکسید (۲ نرمال، ۸/۰ میلی‌لیتر) به آن افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه محلول بنزن سولفونیل کلرید (۴ میلی‌مول، ۳۲۰ میکرولیتر) حل شده در دی‌کلرومتان (۵ میلی‌لیتر) با سرنگ به صورت قطره‌های بسیار ریز آهسته به ظرف واکنش افزوده شد. در ظرف به‌طور کامل پوشانده شد و به مخلوط در همان وضعیت، ۲۴ ساعت زمان داده شد تا به تدریج به دمای اتاق برسد. یک مخلوط دو فاز به‌دست آمد و با جدا کردن حلال که فازی شفاف و بی‌رنگ بود مخلوط نانوذره قهوه‌ای رنگ درون آب به خوبی حل شد. طرح واره تهیه نانوذره‌ها BSATP-AgNPs در شکل ۱ نشان داده شده است.

تهیه محلول‌ها

بافر هپس با غلظت ۰/۰۵ مولار در آب دوبار تقطیر تهیه شد و pH آن به کمک محلول سدیم هیدروکسید در ۷/۴ تنظیم شد. از بافر فسفات ۰/۵ مولار برای تهیه محلول موردنیاز آزمایش دورنگ‌نمایی دورانی CD استفاده شد. برای تهیه محلول، ۱ تا ۲ میلی‌گرم از ct-DNA در ۲ میلی‌لیتر بافر هپس ۰/۰۵ مولار حل و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۷۴

در ثبت طیف‌های فلورسانس سرم آلبومین انسانی و گاوی، پهنای شکاف مونوکروماتور برانگیختگی ۵ نانومتر و تک‌فام‌ساز نشر ۱۰ نانومتر انتخاب شد و در درون سل کوآرتز با طول مسیر یک سانتی‌متر با شدت میانگین آشکارساز ثبت شد. در این مطالعات، نشر ذاتی HSA در λ_{em} برابر با ۳۴۰ نانومتر و نشر ذاتی BSA در λ_{em} برابر با ۳۴۳ و طول موج برانگیختگی (λ_{ex}) برابر با ۲۹۰ نانومتر به کار رفت.

شدت نشر فلورسانس محلول $M \times 10^{-5}$ از HSA و BSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت از نانوذره‌های BSATP-AgNPs در دماهای متفاوت ثبت شد.

در مطالعه نشان‌دهنده جایگاه، پیش و پس از افزودن مقداری از هر کدام از نشان‌دهنده‌های جایگاه (ایوبروفن و وارفارین)، مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلونین افزوده و شدت نشر فلورسانس HSA و BSA ثبت شد. ایوبروفن و وارفارین در λ_{em} برابر با ۲۹۵ نانومتر، نشر بسیار ضعیفی دارند که تداخلی ایجاد نمی‌کند.

اندازه‌گیری طیف دورنگ‌نمایی دورانی

اثر نانوذره‌های BSATP-AgNPs بر ساختار دوم ct-DNA با روش طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی مطالعه شد. طیف‌ها در ناحیه ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر ثبت شد. برای بررسی اثر BSATP-AgNPs بر طیف، DNA غلظت ثابت، $10^{-5} \times 50$ مولار، همراه با افزودن غلظت‌های متفاوت از BSATP-AgNPs در بافر هپس در دمای ۲۹۸ کلونین به کار رفت.

اثر BSATP-AgNPs بر ساختار دوم HSA و BSA به روش طیف‌سنجی CD مطالعه شد. طیف‌ها در گستره ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر در سل کوآرتز ۱ سانتی‌متر ثبت شد. طیف دورنگ‌نمایی دورانی محلول $10^{-6} \times 370$ مولار از HSA و BSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت نانوذره‌ها BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلونین بررسی شد.

اندازه‌گیری گران‌روی

چگونگی تغییرات گران‌روی نسبی $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ محلول در اثر برهم‌کنش با BSATP-AgNPs در این پژوهش بررسی شد. گران‌روی ۱۵ میلی‌لیتر از محلول ct-DNA با غلظت $10^{-5} \times 5/0$ مولار به تنهایی و همراه با مقادیر متفاوت از BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلونین اندازه‌گیری شد. گران‌روی با معادله ۱ محاسبه شد.

$$\eta_0 = (t_{DNA} - t_0) / t_0 \quad (1)$$

که در آن، t مدت لازم برای عبور نمونه DNA مورد نظر و t_0 مدت لازم برای عبور بافر است [۱۴]. در ابتدا زمان عبور ۱۵ میلی‌لیتر بافر از لوله موئین و زمان لازم برای عبور محلول ct-DNA تنها، اندازه‌گیری شد. سپس، محلول‌های ct-DNA همراه با مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs تهیه و زمان لازم برای انتقال محلول‌ها از بین لوله موئین حداقل سه بار برای هر محلول اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر قدرت یونی

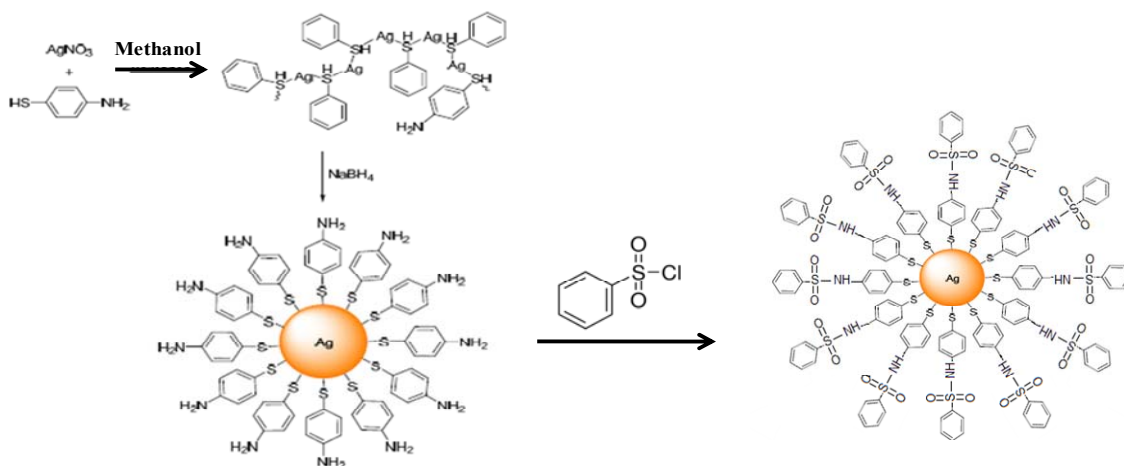
در این بررسی از محلول مادر سدیم کلرید ۴ مولار در بافر هپس 0.05 مولار استفاده شد. برای مطالعه اثر قدرت یونی طیف‌سنجی جذبی فرابنفش - مرئی به کار رفت. بدین منظور در یکی از نسبت‌های غلظتی مشخص از DNA و BSATP-AgNPs و مقادیر متفاوت از نمک NaCl افزوده شد و طیف‌های جذبی ثبت شد.

نتیجه‌ها و بحث

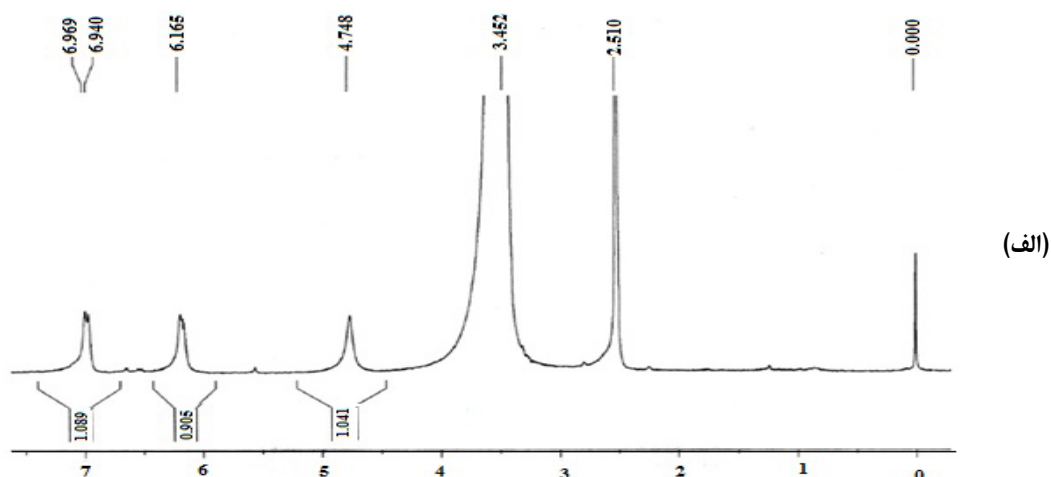
ویژگی‌های نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs شکل ۱ طرح‌واره تهیه مستقیم نانوذره‌های نقره عامل‌دار شده با ۴- بنزن سولفونامیدتیوفنل را نشان می‌دهد. در نانوذره‌های فلزی پدیده تشدید پلاسمون سطحی به شعاع نانوکره و ضریب شکست محیط اطراف آن بستگی دارد و موجب ویژگی‌های

آمین است. پیک په‌ن ناحیه ۴/۷۵ ppm به گروه NH_2 اختصاص دارد. در شکل ۲-ب، طیف ^1H NMR مربوط به نانوذره‌هایی است که با گروه بنزن سولفونیل عامل‌دار شده‌اند. دو گروه پروتون به صورت چندتایی در ناحیه ۷/۵۶ و ۷/۳ و به ترتیب مربوط به پروتون‌های ارتو نسبت به گروه سولفونیل و سه پروتون دیگر است که در ناحیه آروماتیک قرار گرفته است [۱۱، ۱۶ و ۱۷].

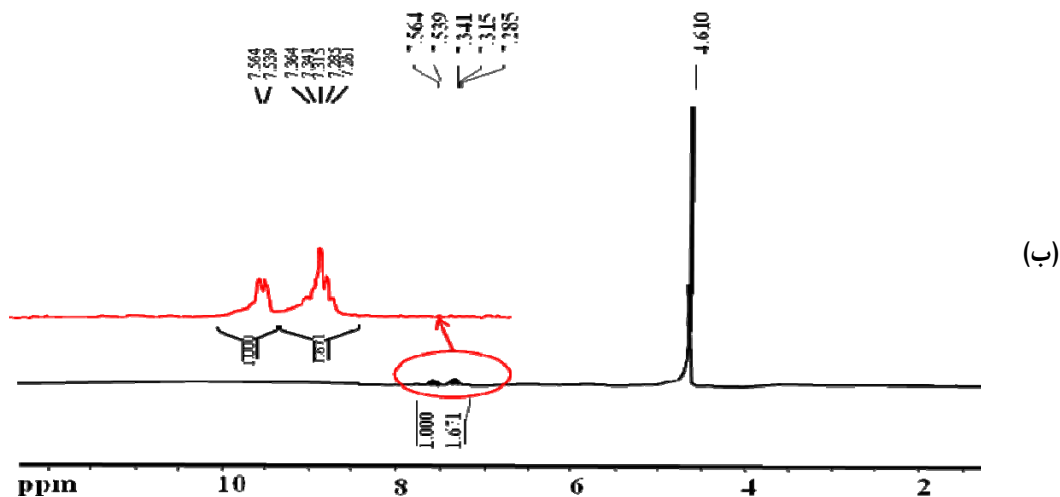
نوری بی‌همتا آنهاست [۱۵]. پیک جذبی نانوذره‌های نقره در گستره ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر قرار دارد (شکل ۵). برای اثبات عامل‌دار شدن نقره از روش رزونانس مغناطیسی هسته استفاده شد. طیف ^1H NMR نانوذره نقره عامل‌دار شده با ۴-آمینوتیوفنل در شکل ۲-الف نشان داده شده است. دو پیک دوتایی در ۶/۹۵ و ۶/۱۰ ppm مربوط به پروتون‌های موقعیت ارتو نسبت به گروه تیول و دیگر پروتون‌های ارتو نسبت به گروه



شکل ۱ طرح‌واره تهیه مستقیم نانوذره نقره عامل‌دار شده با ۴-بنزن سولفونامیدتیوفنل (BSATP-AgNPs)



شکل ۲ طیف‌های ^1H NMR نانوذره‌های نقره عامل‌دار شده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن سولفونامیدتیوفنل (ب)

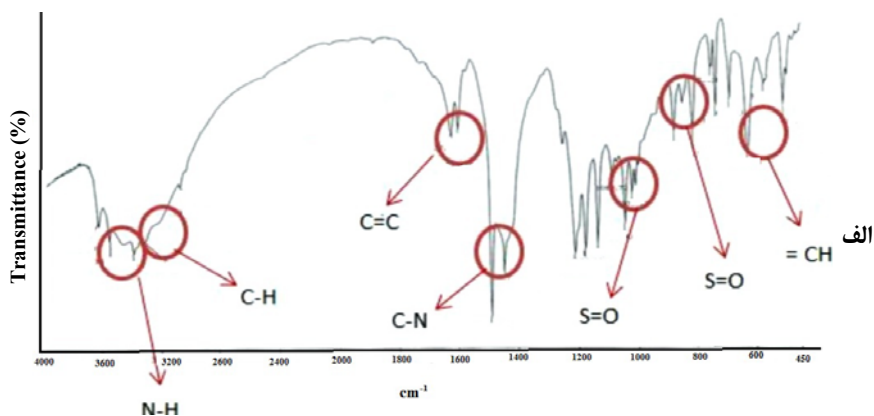


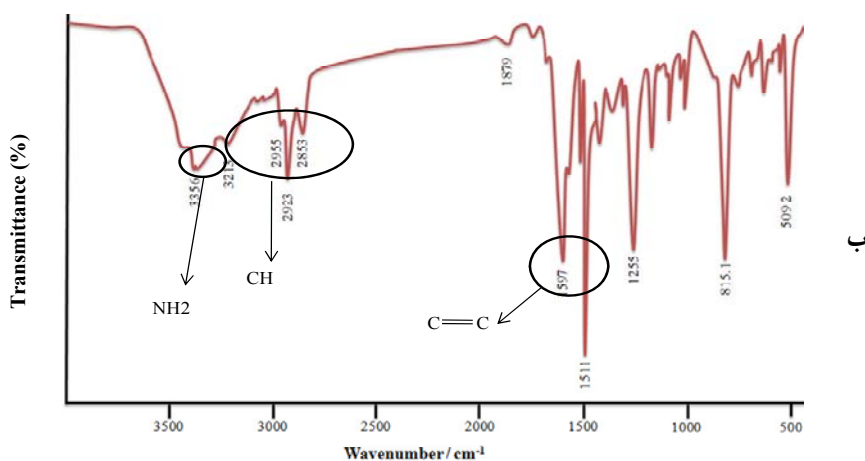
ادامه شکل ۲ طیف های ^1H NMR نانوذره های نقره عامل دار شده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن سولفونامیدتیوفنل (ب)

برای شناسایی ماهیت سطح نانوذره های نقره عامل دار شده، طیف های FTIR آن ها در شکل ۳ آورده شده است. حضور پیک های ارتعاشی در ناحیه 3356 (NH_2), 2853 تا 2955 (C-H) و 1470 تا 1597 (C=C)

آروماتیک) در شکل ۳-الف شاهدهی برقرار گرفتن ۴-آمینوتیوفنل بر نانوذره های نقره است. پیک های ارتعاشی در شکل ۳-ب مربوط به طیف فروسرخ نانوذره های BSATP-AgNPs که در 3300 تا 3600 (NH), 3060 (CH), 1590 تا 1620 (C=C), 1489 (CN), 1080 و 870 (S=O)

633 ($=\text{CH}$) پدیدار شده اند، دلیلی بر تهیه موفق نانوذرات BSATP-AgNP است [۱۶].
اندازه و شکل نانوذره های تولیدی با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تعیین شد. شکل ۴ تصویر TEM از پودر نانوذره های نقره را نشان می دهد. با توجه به این شکل، نانوذره های نقره کروی با میانگین اندازه ۱۰ تا ۱۲ نانومتر است.

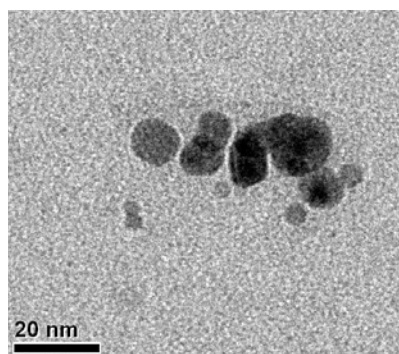




شکل ۳ طیف‌های FTIR نانوذره‌های نقره عامل دار شده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن سولفونامیدتیوفنل (ب)

می‌تواند به صورت اثر بیش‌رنگی^۱ (افزایش در شدت جذب)، اثر کم‌رنگی^۲ (کاهش شدت جذب)، انتقال به سرخ^۳ (انتقال به سمت طول موج‌های بیشتر - جابه‌جایی سرخ) و انتقال به آبی^۴ (انتقال به طول موج‌های کمتر - جابه‌جایی آبی) باشد. تغییر الگو روی هم افتادگی بازهای DNA، شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین لایه‌های مکمل موجود در ساختار DNA، شکسته شدن پیوندهای کووالانسی بین جفت بازهای DNA و تغییر در ساختار مارپیچ و صورت‌بندی DNA موجب ایجاد تغییرات در طیف جذبی می‌شود [۱۹ و ۲۰].

طیف جذبی فرابنفش-مرئی مربوط به تیترا کردن نانوذره‌های BSATP-AgNPs در محلول بافر هپس با افزایش ct-DNA در شکل ۵-الف آورده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود با هر بار افزودن DNA به سل حاوی نانوذره‌ها تغییرات مشهودی در طیف جذبی BSATP-AgNPs رخ می‌دهد. این تغییرها در طیف جذبی BSATP-AgNPs به شکل



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs

مطالعه بر همکنش BSATP-AgNPs با DNA تیموس گوساله طیف‌سنجی جذبی فرابنفش-مرئی

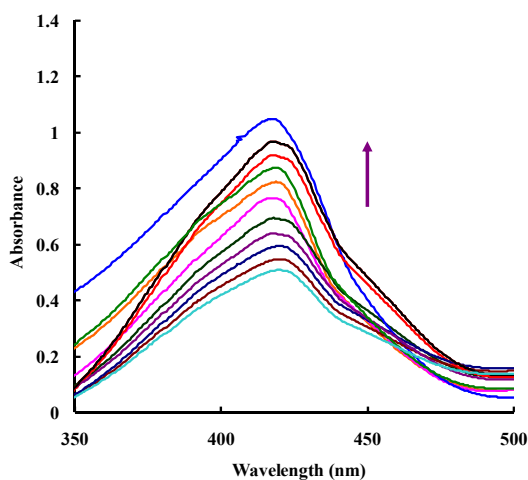
طیف‌سنجی جذبی فرابنفش-مرئی روش مناسبی برای بررسی برهم‌کنش مولکول‌های متفاوت با DNA است [۱۸ و ۱۹]. مولکول DNA به دلیل انتقالات π به π^* مربوط به جفت بازهای DNA پیک بیشینه جذبی (λ_{max}) در طول موج ۲۶۰ نانومتر دارد. برهم‌کنش DNA با لیگندهای متفاوت، می‌تواند λ_{max} و ضریب جذب مولی (ϵ) را تغییر دهد. این تغییرها طیفی

1. Hyperchromic effect
2. Hypochromic effect
3. Bathochromic shift
4. Hypsochromic shift

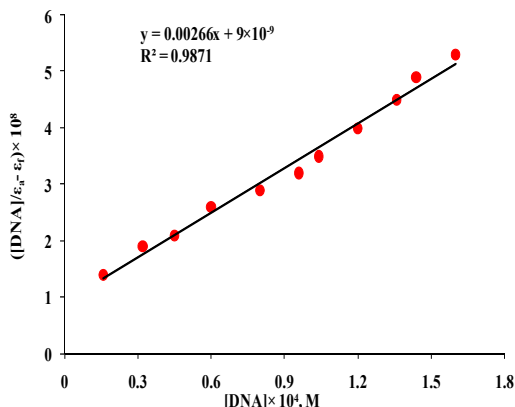
افزایش شدت در ۴۱۰ نانومتر با تغییر کمی در طول موج بیشینه است.

جابه‌جایی کوچکتر از ۷ نانومتر یا عدم وجود جابه‌جایی در طول موج جذبی می‌تواند دلیل بر پیوند شیاری باشد. همچنین، تغییر جزئی در طول موج جذب در این نوع پیوند می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در قطبیت اطراف مولکول باشد. تحت شرایطی که جابه‌جایی در طول موج کم است نمایانگر پیوند ضعیف دارو با جفت بازها است و پیش‌بینی می‌شود برهم‌کنش با شیاریهای کوچک با بی‌نظمی کمی در ساختار DNA همراه باشد [۱۹ تا ۲۱]. با توجه به افزایش در شدت جذب همراه با هیپسوکرومی کمتر از ۷ نانومتر، نوع پیوند الکترواستاتیک برای برهم‌کنش BSATP-Ag NPs با DNA پیشنهاد می‌شود. به منظور محاسبه ثابت پیوند DNA با BSATP-Ag NPs به روش طیف‌سنجی جذبی فرابنفش-مرئی تیترا کردن غلظت ثابتی از BSATP-Ag NPs با DNA انجام شد. اگر فرض شود که پس از تیترا کردن محلول، تعادل زیر برقرار می‌شود از معادله ولف-اشمیر (معادله ۲) می‌توان برای محاسبه ثابت پیوند استفاده کرد [۲۲].

الف



ب



شکل ۵ طیف جذبی فرابنفش-مرئی محلول 5.0×10^{-5} مولار نانوذره‌های BSATP-AgNPs در حضور غلظت‌های متفاوت از DNA (1.0×10^{-4} تا 1.6×10^{-4}) مولار در دمای ۲۹۸ کلوین و در pH=۷/۴ و نمودار معادله ولف-اشمیر در برهم‌کنش نانوذره‌های BSATP-AgNPs با DNA در دمای ۲۹۸ کلوین (ب) واکنش ۱



$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (2)$$

که در آن، [DNA] غلظت DNA افزوده شده و ϵ_f ضریب جذب مولی برای BSATP-AgNPs در حالت آزاد، ϵ_b ضریب جذب مولی BSATP-AgNPs در کمپلکس و ϵ_a ضریب جذب ظاهری است. با رسم نمودار (شکل ۵-ب) و استفاده از معادله ولف-اشمیر ثابت پیوند محاسبه شد. ثابت پیوند از نسبت شیب به عرض از مبدأ نمودار به دست آمد. مقدار K_b به دست آمده برابر با $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($0.9 \pm 3/0$) بود که قابل مقایسه با مقادیر گزارش شده برای پیونددهنده‌های الکترواستاتیک و شیاری است [۲۳ و ۲۴].

طیف‌سنجی فلوروسانس

مطالعه بر طیف فلوروسانس درشت‌مولکول‌ها و به‌ویژه خاموش شدن فلوروسانس، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد

هر دو) می‌توان از وابستگی خاموشی به عواملی مانند غلظت خاموش‌کننده و دما استفاده کرد.

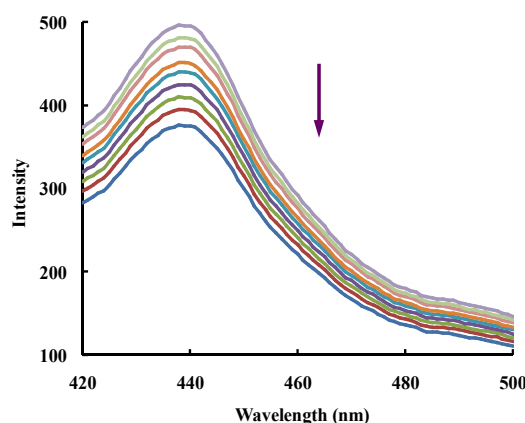
معادله استرن-ولمر (معادله ۳) رابطه مقدار خاموشی به غلظت خاموش‌کننده را نشان می‌دهد.

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

که در آن، F_0 و F به ترتیب شدت فلورسانس نانوذرات BSATP-AgNPs در نبود و بودن خاموش‌کننده K_{sv} ، ثابت خاموشی استرن ولمر، k_q ثابت سرعت خاموشی DNA نشرکننده، τ_0 طول عمر نشرکننده (در نبود خاموش‌کننده) و $[Q]$ غلظت DNA است. رسم تغییرات F_0 / F بر حسب غلظت‌های متفاوت DNA در گستره ویژه‌ای از غلظت، خطی است و شیب خط به دست آمده K_{sv} است (شکل ۷). با توجه به مقدار میانگین τ_0 درشت‌مولکول‌های زیستی (k_q) 10^{-8} محاسبه شد. تغییرهای نشر نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با DNA در دماهای متفاوت ثبت شد. جدول ۱ نتایج بررسی داده‌ها را در دماهای متفاوت نشان می‌دهد.

افزایش دما موجب افزایش سرعت نفوذ مولکول‌ها و نیز افزایش میزان برخورد‌ها می‌شود. در نتیجه مقدار ثابت خاموشی دینامیک با افزایش دما افزایش می‌یابد. در صورتی که سازوکار خاموشی استاتیک باشد، حالت عکس ممکن است رخ دهد، یعنی افزایش دما می‌تواند موجب سست‌شدن پیوند بین نشرکننده و خاموش‌کننده شود و در نتیجه، ثابت خاموشی کاهش یابد. داده‌های جدول ۱ حاکی از کاهش ثابت خاموشی با افزایش دما است که نشان می‌دهد به احتمال سازوکار خاموشی استاتیک است. k_q نیز با افزایش دما کاهش یافته است، مقدار آن در ۲۹۸ کلوین برابر با $4.34 \times 10^{12} M^{-1}$ بود که این مقدار بیشتر از بیشینه k_q برای خاموشی دینامیک ($2 \times 10^{10} M^{-1}$) در درشت‌مولکول‌هاست و موید سازوکار خاموشی استاتیک است [۱۹].

ساختار فضایی درشت‌مولکول، جایگاه‌های پیوند، برهم‌کنش حلال، درجه انعطاف‌پذیری، فواصل درون مولکولی و غیره به دست دهد. در واقع خاموش شدن فلورسانس به فرایندی گفته می‌شود که موجب کاهش شدت فلورسانس نمونه شود [۲۵]. شکل ۶ تغییرات نشر فلورسانس نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با افزایش DNA در نسبت‌های مولی متفاوت نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تغییرها منظم و با افزایش DNA شدت فلورسانس کمپلکس کاهش یافته است.



شکل ۶ طیف فلورسانس محلول 5.0×10^{-6} مولار نانوذرات BSATP-AgNPs در حضور غلظت‌های متفاوت از DNA (3.0×10^{-4} - 0.1) مولار در ۲۹۸ کلوین و در $pH = 7.4$

به‌طور خلاصه، خاموشی فلورسانس از راه سازوکارهای دینامیک و استاتیک صورت می‌گیرد [۲۵]. در خاموشی استاتیک، در حالت پایه مولکول، بین نشردهنده و خاموش‌کننده پیوند برقرار شده و گونه جدیدی تشکیل می‌شود که نشر ندارد. از این‌رو، شدت فلورسانس نشردهنده خاموش می‌شود. در حالی که در خاموشی دینامیک یا برخوردی، نشردهنده در حالت برانگیخته یا خاموش‌کننده برخورد می‌کند و در نتیجه موجب از دست رفتن انرژی به صورت غیرتابشی و خاموشی فلورسانس می‌شود. برای پی‌بردن به انواع سازوکار خاموشی (استاتیک یا دینامیک یا

که در آن، F_0 و F به ترتیب شدت فلورسانس BSATP-AgPs در نبود و بودن مقادیر متفاوت خاموش کننده DNA و n استوکیومتری کمپلکس است. نتیجه‌های به دست آمده از معادله خطی $\log(F_0 - F)/F$ در مقابل $\log[Q]$ در دماهای متفاوت در جدول ۲ آورده شده‌اند. با افزایش دما، ثابت پیوند کاهش یافت که به احتمال نشان دهنده کاهش پایداری کمپلکس DNA-BSATP-AgNPs در دماهای بالاتر است.

جدول ۲ مقادیر محاسبه شده تشکیل و استوکیومتری برهم کنش BSATP-AgNPs با ct-DNA در دماهای متفاوت

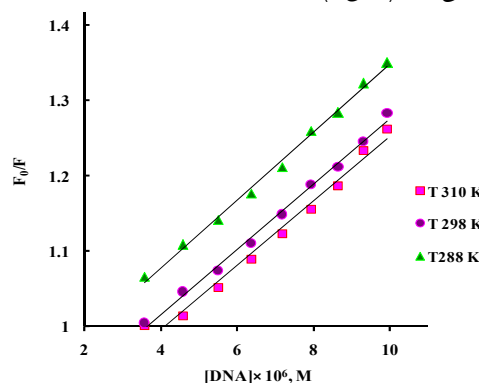
$K_f (M^{-1}) \times 10^6$	$\log K_f$	n	T (K)
۱,۴۱	۶,۱۵	۱,۳۲	۲۸۸
۱,۱۲	۶,۰۵	۱,۳۲	۲۹۸
۸,۹۰	۵,۹۵	۱,۳۲	۳۱۰

از داده‌های فلورسانس در دماهای متفاوت برای محاسبه عامل‌های ترمودینامیکی استفاده شد. محاسبه تغییرات آنتالپی، آنتروپی و انرژی آزاد گیبس در طی یک واکنش اطلاعات مفیدی را در ارتباط با وضعیت تعادلی در اختیار می‌دهد. ΔH^0 و ΔS^0 با استفاده از شیب و عرض از مبدأ منحنی و انت-هوف تعیین شد. این منحنی تغییرات $\ln K_f$ در مقابل $1/T$ است که شیب منحنی $(-\Delta H^0/R)$ و عرض از مبدأ آن $\Delta S^0/R$ است.

$$\ln K_f = -(\Delta H^0/RT) + (\Delta S^0/RT) \quad (5)$$

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با توجه به مقدار آنتالپی فرایند تشکیل کمپلکس در گستره دمایی مورد مطالعه گرمازا است ($\Delta H^0 < 0$). با توجه به مثبت بودن آنتروپی می‌توان گفت که تشکیل کمپلکس-BSATP-AgNPs-DNA منجر به افزایش بی‌نظمی در محیط می‌شود.

مطالعه جذب فرابنفش-مرئی برای اثبات سازوکار خاموشی سودمند است. خاموشی دینامیک که از برخورد مولکول‌ها با هم به دست می‌آید، به‌طور معمول تأثیری در طیف جذبی ندارد ولی خاموشی استاتیک که از تشکیل کمپلکس BSATP-AgPs-DNA به دست می‌آید، موجب تغییر در طیف جذبی UV-Vis می‌شود. با افزودن DNA به محلول نانوذرها BSATP-AgNPs مقدار جذب افزایش یافته است که می‌تواند حاکی از تشکیل کمپلکس باشد (شکل ۶).



شکل ۷ منحنی‌های استرن ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس نانوذره‌های نقره در حضور غلظت‌های متفاوت DNA در دماهای ۲۸۸، ۲۹۸ و ۳۱۰ کلوین

جدول ۱ مقادیر محاسبه شده ثابت خاموشی استرن ولمر و ثابت سرعت خاموشی در دماهای متفاوت مربوط به برهم کنش نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs و DNA

T (K)	$K_{sv} (M^{-1})$	$Kq \times 10^{12} (M^{-1} S^{-1})$	N
۲۸۸	$۴,۵۰ \times ۱۰^۴$	۴,۵۰	۰,۹۰
۲۹۸	$۴,۳۴ \times ۱۰^۴$	۴,۳۴	۰,۸۵
۳۱۰	$۴,۲۵ \times ۱۰^۴$	۴,۲۵	۰,۸۳

ثابت پیوند (K_f) DNA با نانوذرها BSATP-AgNPs با استفاده از داده‌های فلورسانس به کمک معادله ۴ محاسبه شد.

$$\log (F_0 - F)/F = \log K_f + n \log [Q] \quad (4)$$

جدول ۳ مقادیر ترمودینامیکی به دست آمده برای برهم کنش

BSATP-AgNPs و DNA

ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (J ⁻¹ mol ⁻¹ S ⁻¹)	T (K)
۳۳,۸۴	-۱۵,۵۰ ± ۰,۴۸	۶۳,۶۸ ± ۱,۶۳	۲۸۸
۳۴,۴۵			۲۹۸
۳۵,۲۵			۳۱۰

مشخص کرد. مشخصه طیف CD مربوط به B-DNA راست گرد یک نوار منفی در ۲۴۵ نانومتر و یک نوار مثبت در ۲۷۵ نانومتر است [۲۰]. طیف منفی متناظر با ساختار ماریچ دوگانه DNA و طیف مثبت متناظر با روی هم افتادگی جفت بازهای DNA است. داروها بسته به ساختارشان اثرات متفاوتی بر صورت بندی DNA می گذارند. اثر افزایش مقادیر BSATP-AgNPs بر طیف دورنگ نمایی DNA خالص بررسی شد. طیف های CD نشان داد که افزایش نانوذره های BSATP-AgNPs به DNA موجب افزایش شدت نوار منفی همراه با یک جابه جایی اندک (نانومتر ۳ ≈) و کاهش شدت نوار مثبت شد. طیف CD شامل یک گروه مثبت در ۲۷۵ نانومتر به دلیل انباشتی پایه و یک گروه منفی در ۲۳۵ نانومتر با توجه به ماریچی شکل بودن است. پیوند شیار ساده و برهم کنش الکترواستاتیک مولکول های کوچک با DNA هیچ اختلالی در شدت دو نوار ایجاد نمی کند یا اینکه اختلال کمی به وجود می آید. DNA با BSATP-AgNPs اختلال کمی از دو نوار را نشان می دهد که بیانگر تعامل غیرجای گیری بین لایه های BSATP-AgNPs و DNA، همچنین، نوع پیوند شیاری است. تغییرهای مشاهده شده قابل مقایسه با نتایج گزارش شده در مقالات مشابه است. برخی پژوهشگران معتقدند که افزایش و کاهش مشاهده شده در نوارهای مثبت و منفی، ممکن است اشاره به انتقال ساختار B-DNA به سمت A-DNA باشد [۲۷]. برخی از پژوهشگران نیز معتقدند که این پدیده ناشی از پیوند به شیاری های DNA است که موجب پایداری B-DNA می شود. برخی دیگر معتقدند که افزایش نوار مثبت DNA در نتیجه اختلال در ساختار DNA است [۲۸]. در پژوهشی از احمدی و همکارانش، روش طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی برای مطالعه تغییرهای ساختاری DNA در برهم کنش با ترکیب ۲-ایمیدازولیدینتینون به کار گرفته شده است. تغییرات CD آن

نیروهای اصلی در پیوند مولکول های کوچک به یک درشت مولکول و در آب به طور اصلی شامل برهم کنش واندروالسی، برهم کنش الکترواستاتیک و اثر آب گریزی (رهایی مولکول از لایه آبپوشی به داخل توده حلال) است. تیماشف، رز و سابرامانین [۲۶] روابط بین عامل های ترمودینامیکی و فرایند درگیر در پیوند را مشخص کردند، برپایه این نظریه:

- اگر $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 > 0$ باشد، فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، یونی است.

- هنگامی که $\Delta S^0 < 0$ و $\Delta H^0 < 0$ باشد فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، واندروالسی یا تشکیل پیوند هیدروژنی است.

- هنگامی که $\Delta S^0 > 0$ و $\Delta H^0 > 0$ فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، پیوستگی آب گریزی است.

برپایه داده های تغییرهای آنتالپی (ΔH^0) و تغییرات آنتروپی (ΔS^0)، مدل برهم کنش بین دارو و درشت مولکول زیستی قابل پیش بینی است [۲۶]. با توجه به اینکه در این مطالعه $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 > 0$ بود (جدول ۳) پیش بینی می شود که فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند BSATP-AgNPs به DNA، یونی باشد.

طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)

طیف CD در گستره طول موج فرابنفش-مرئی اطلاعات مهمی در مورد صورت بندی اسیدهای نوکلئیک محلول فراهم می آورد. با دورنگ نمایی دورانی می توان نوع پیوند لیگاند به DNA را تشخیص داد، ولی نمی توان جایگاه دقیق پیوند را

پلی‌آنیون است و به دلیل وجود دافعه بارهای منفی در آن، یک مولکول گسترده و طویل است. زمانی که کاتیون‌ها (مانند یک کاتیون فلزی) با پیوند الکترواستاتیک با گروه‌های فسفات بر هم کنش می‌دهند، اندکی از بار منفی DNA را خنثی می‌کنند که موجب انقباض رشته DNA و کاهش گران‌روی آن می‌شوند [۳۱]. لیگاندهایی که با شیارهای DNA پیوند می‌خورند موجب ایجاد تغییرهای مثبت یا منفی می‌شوند که مقدار این تغییرها اندک بوده یا هیچ اثری در گران‌روی DNA ندارند [۲۷]. نمودار تغییرهای گران‌روی نسبی ($\eta/\eta_0^{1/3}$) محلول DNA در مقابل R (نسبت غلظت متفاوت BSATP-AgNPs/[DNA]) در حضور مقادیرهای متفاوت BSATP-AgNPs در محلول رسم شد. تغییرات جزئی گران‌روی DNA با افزایش نانوذرات نقره مشاهده شد که نشان‌دهنده پیوند ضعیف BSATP-AgNPs با DNA در ناحیه شکاری است [۳۱].

بررسی اثر قدرت یونی بر برهم‌کنش DNA با نانوذرها BSATP-AgNPs

مطالعه اثر قدرت یونی روشی کارآمد برای تشخیص نوع پیوند دارو به DNA است. اگر دارو بین جفت‌بازهای مجاور هم از DNA جای‌گیری کند، تغییرهای محیطی را حس نمی‌کند زیرا ترکیبی که جای‌گیری بین لایه‌ای می‌کند تحت حفاظت جفت‌بازهای بالایی و پایینی است. در نوع پیوند شکاری چون مولکول دارو بیشتر در دسترس حلال قرار دارد، حساس به تغییرهای محیطی است و گرچه با افزایش قدرت یونی، پیوند بین مولکول و مارپیچ سست می‌شود، ولی برای مولکول‌های پیوندشده شکاری سخت است که به داخل دارو نفوذ کنند [۲۷]. در نوع پیوند یونی، مولکول دارو متصل به DNA با افزایش قدرت یونی وارد یک رقابت با یون‌های نمک در پیوند به DNA شده و در داخل محلول آزاد می‌شود. این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نمک، جذب فرابنفش سرمی محلول

نشان می‌دهد که نوار ۲۴۵ نانومتر شدتش را کم کرده و (≈ 3 نانومتر) به سمت طول موج‌های بلندتر جابه‌جا شده در حالی که نوار مثبت در ۲۷۵ نانومتر یک افزایش جزئی به سمت مقادیر مثبت داشته است. در پژوهش آن‌ها حدس زده شد که افزایش در نوار ۲۷۵ نانومتر در اثر تغییرات در الگو روی هم افتادگی جفت‌بازها است. در محلول‌های آبی، DNA یک مولکول صلب نیست، و مولکول‌های آب نقش مهمی روی صورت‌بندی DNA ایفا می‌کنند. برهم‌کنش ۲-ایمیدازولیدیتینون با شیارهای کوچک DNA به صورت یک رقابت بین مولکول‌های آب که DNA در آن حل شده، اتفاق می‌افتد. بنابراین، آب موجود در محیط کوچک اطراف DNA کاهش یافته و صورت‌بندی DNA از شکل B به شکل A تغییر می‌کند [۲۹]. بنابراین، حدس زده می‌شود تغییرهای مشاهده شده می‌تواند ناشی از تغییر صورت‌بندی B-DNA به A-DNA از راه برهم‌کنش با شیارهای DNA باشد.

اندازه‌گیری گران‌روی

داده‌های اسپکتروسکوپی برای مطالعه برهم‌کنش لازم، اما کافی نیستند. تغییرهای هیدرودینامیک حلال نسبت به افزایش طول درشت‌مولکول‌های حل‌شده در آن‌ها بسیار حساس هستند. بنابراین، می‌توان برای مطالعه برهم‌کنش در محلول و در نبود داده‌های بلورشناسی و NMR، از گران‌روی استفاده کرد [۲۷]. ترکیب‌های جای‌گیرنده بین لایه‌ای کلاسیک معروف از جمله اندیوم برماید و پروفلاوین موجب افزایش گران‌روی نسبی محلول‌های DNA می‌شوند. این افزایش نتیجه قرار گرفتن مولکول‌های این ترکیب‌ها بین بازهای DNA و باز شدن رشته DNA و طویل شدن مارپیچ دو رشته‌های DNA است. در مقابل یک بین لایه‌ای شدن جزئی یا جای‌گیری بین لایه‌ای غیر کلاسیک لیگاند مارپیچ DNA را خم کرده و طول مؤثر آن و به‌طور هم‌زمان گران‌روی را کاهش دهد [۳۰]. مولکول DNA یک مولکول

AgNPs است. HSA دارای یک نوار جذبی بزرگ در ۲۰۰ تا ۲۳۰ نانومتر به دلیل انتقالات الکترونی π به π^* در CO اسکلت پلی پپتیدی ساختار و نوار جذبی دوم با بیشینه جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر ناشی از اسکلت پلی پپتیدی و باقی مانده های آمینو اسید آروماتیک به ویژه تریپتوفان است [۳۴].

باقی مانده های آمینو اسید، به ویژه تریپتوفان، به محیطی که در آن قرار دارند حساس هستند. تغییر در صورت بندی و قطبیت محیط اطراف می تواند شدت جذب یا طول موج بیشینه جذب را تغییر دهد.

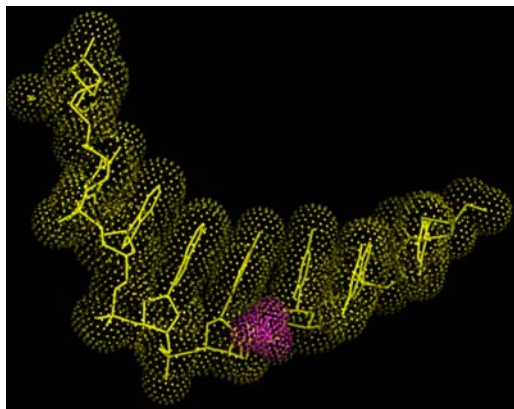
تغییرهای طیف جذبی HSA و BSA در نبود و بودن غلظت های متفاوت BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلوین بررسی شد. برپایه نتایج به دست آمده از مطالعات، شدت جذب HSA و BSA بدون جابه جایی در طول موج بیشینه جذب در ۲۸۰ نانومتر با افزودن BSATP AgNPs کاهش یافت. کاهش جذب با افزایش غلظت BSATP-AgNPs، تغییر در صورت بندی HSA و BSA به دلیل تشکیل یک گونه جدی پروتئین-BSATP-AgNPs را نشان می دهد. پیوند پپتیدی ویژگی جزئی دوگانه دارد، پیوند BSATP-AgNPs به آلبومین ممکن است مانع از چرخش اطراف پیوند پپتیدی و در نتیجه منجر به تغییر در صورت بندی پروتئین شود. دلیل دیگر تغییر صورت بندی می تواند گسترده تر شدن رشته مولکول پروتئین بر اثر افزایش BSATP AgNPs به پروتئین باشد، این امر ممکن است قطبیت اطراف تریپتوفان را تغییر دهد. از این رو، آب گریزی را نیز تغییر می دهد [۳۴].

همان طور که از قبل مطرح شد، خاموشی دینامیک هیچ اثری بر طیف جذبی مولکول ندارد. کاهش در طیف جذبی HSA و BSA با افزودن BSATP-AgNPs نشان دهنده وجود برهم کنش بین BSA - BSATP-AgNPs و HAS - BSATP-AgNPs و خاموشی استاتیک است. تغییرها در نوار جذبی دوم در ۲۸۰ نانومتر ممکن است حاکی

کاهش یافته است که نشان دهنده رقابت یون Na^+ با نانوذره های نقره در پیوند به DNA بوده و تعیین کننده نوع پیوند است.

مطالعه های مدل سازی مولکولی برهم کنش نانوذره ها و DNA

پژوهش های داکینگ، چندین دیدگاه از برهم کنش بین لیگاند و درشت مولکول را فراهم می کند که می تواند نتیجه های آزمایشگاهی را تایید کند. پیوند دهنده های شیارهای کوچک به منظور قرارگیری در انحنا یاریک شیار ماریچ و با جابه جایی مولکول آب اجازه چرخش پیچشی را به آن می دهد [۳۲]. مطابق با نتیجه های به دست آمده از مطالعات داکینگ صورت بندی مولکول BSATP-4-BSATP AgNPs پس از پایدار شدن انرژی با مدل سازی، انحنا ی طبیعی شیار کوچک B-DNA است [۳۳] (شکل ۷).



شکل ۷ نتایج داکینگ مولکولی بررسی ساختار سه بعدی برهم-کنش BSATP-AgNPs با توالی B-DNA در تشکیل جهت گیری بهینه و محل پیوند BSATP-AgNPs

بررسی برهم کنش HSA و BSA با نانوذره های نقره عامل دار شده با ۴-بنزن سولفونامید تیوفنیل طیفسنجی جذبی فرابنفش- مرئی طیفسنجی جذبی UV-Vis یک روش ساده و کاربردی به منظور مطالعه برهم کنش بین سرم آلبومین و BSATP-

نشریه پژوهش های کاربردی در شیمی (JARC)

از تغییر در محیط اطراف تریپتوفان به دلیل حضور BSATP AgNPs باشد.

مطالعه‌های انتقال انرژی فلورسانس

طیف‌سنجی فلورسانس روشی کارآمد در مطالعه برهم‌کنش درشت‌مولکول‌ها یا ترکیب‌های دارویی است. مطالعه طیف‌سنجی فلورسانس برهم‌کنش HSA و BSATP برپایه این واقعیت است که باقی‌مانده‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلین در پروتئین‌ها دارای فلورسانس ذاتی هستند. از آنجاکه فنیل‌آلین بهره‌کوانتومی پایینی دارد و تیروزین به‌طور معمول یونیده می‌شود و یا نزدیک گروه‌های آمینو، گروه کربوکسیل یا باقی‌مانده تریپتوفان خاموش می‌شود، نشر فلورسانس باقی‌مانده تیروزین نیز کم است. از این‌رو، شدت نشر فلورسانس ذاتی HSA و BSATP بیشتر ناشی از باقی‌مانده تریپتوفان است [۳۴ و ۳۵].

برای مطالعه پیوند BSATP-AgNPs به آلبومین سرم انسانی و آلبومین سرم گاو، طیف فلورسانس HSA و BSATP در گستره ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر در نبود و بودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs ثبت شد. نشر فلورسانس بدون جابه‌جایی در طول موج بیشینه با افزودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs خاموش شد طول موج بیشینه نشر تریپتوفان داخل پروتئین در محیط آبی بر اثر عدم تاخوردگی پروتئین از طول موج‌های پایینتر به بالاتر جابه‌جا می‌شود و شدت نشر تریپتوفان داخل پروتئین‌های بزرگ و طیف‌نشری آن منعکس‌کننده میانگین از محیط تریپتوفان است. همچنین، تغییر در نشر تریپتوفان، به دلیل تغییر در صورت‌بندی پروتئین است [۳۴ تا ۳۶]. خاموشی مشاهده‌شده در طیف فلورسانس HSA و BSATP پس از افزودن BSATP-AgNPs ناشی از تغییر در صورت‌بندی پروتئین و نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش بین BSATP-AgNPs با HSA و BSA است.

مطالعه خاموشی فلورسانس HSA و BSA

همان‌طور که پیش از این بیان شد، خاموشی فلورسانس از راه سازوکارهای دینامیک و استاتیک صورت می‌گیرد و به‌منظور تشخیص نوع سازوکار خاموشی (استاتیک یا دینامیک و یا هر دو) می‌توان از وابستگی خاموشی به عواملی مانند غلظت خاموش‌کننده و دما استفاده کرد. از معادله استرن - ولمر برای بررسی سازوکار خاموشی نانوذره‌های BSATP AgNPs با HSA و BSA در دمای ۲۹۸ کلوین استفاده شد. به‌طور کلی انحراف مثبت از خطی بودن منحنی استرن - ولمر زمانی اتفاق می‌افتد که ترکیبی از خاموشی استاتیک و دینامیک روی داده باشد [۳۷] و یا با افزایش غلظت خاموش‌کننده ماهیت درشت‌مولکول تغییر کرده و موجب تغییر روند خاموشی‌شده باشد. منحنی خطی استرن - ولمر به‌طور کلی نشان‌دهنده یک نوع نشرکننده در پروتئین است که دسترسی یکسانی به خاموش‌کننده دارند. همچنین، می‌تواند به این معنی باشد که تنها یک سازوکار خاموشی دینامیک یا استاتیک اتفاق افتاده است. همچنین، برپایه بررسی‌های ایتینک [۳۸]، مشخص شده که اگر فرض شود که سازوکار خاموشی فلورسانس دینامیک باشد با مشاهده انحراف مثبت مشخص می‌شود که فرایند خاموشی استاتیک اضافی اتفاق افتاده است (معادله ۷).

$$F_0/F = 1 + K_D [Q] (1 + K_S [Q]) \quad (7)$$

که در آن، K_D ثابت فرونشانی دینامیک و K_S ثابت خاموشی استاتیک است. اگر $K[Q]$ خیلی کوچک باشد برپایه بسط مک‌لورن $\exp K[Q] = 1 + K[Q]$ که در اینجا مقدار $K_D[Q]$ کوچک و K_D به صورت V نام‌گذاری شده است. پس به منظور تعیین ثابت خاموشی استاتیک و دینامیک، رابطه اصلاح‌شده استرن ولمر به کار برده شده است [۳۹].

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] (\exp V[Q]) \quad (8)$$

با رسم منحنی $\text{Log } F_0/F$ در مقابل $\text{Log } [Q]$ ثابت پیوند از عرض از مبدأ منحنی خطی قابل محاسبه است. نتایج نشان داد که ثابت پیوند با افزایش دما کاهش می‌یابد (جدول ۵). این کاهش به احتمال مربوط به کاهش پایداری گونه‌های دماهای بالاتر است.

جدول ۵ مقادیر محاسبه‌شده ثابت پیوند و استوکیومتری برهم‌کنش BSATP-AgNPs با HSA و BSA در دماهای متفاوت

نمونه	T(K)	n	$\log K_f$	R^2
HSA	۲۸۸	۱٫۱۰	۵٫۲۲	۰٫۹۸
	۲۹۸	۱٫۰۹	۴٫۷۲	۰٫۹۷
	۳۱۰	۱٫۰۱	۳٫۹۱	۰٫۹۲
BSA	۲۸۸	۱٫۵۰	۷٫۱۲	۰٫۹۸
	۲۹۸	۱٫۵۰	۷٫۰۲	۰٫۹۸
	۳۱۰	۱٫۴۸	۶٫۷۶	۰٫۹۹

با کمک داده‌های فلورسانس محاسبه تغییرات آنتالپی، آنتروپی و انرژی آزاد گیبس در طی واکنش اطلاعات مفیدی را در ارتباط با وضعیت تعادلی در اختیار قرار می‌دهد. به طور معمول ΔH^0 و ΔS^0 با شیب و عرض از مبدأ منحنی وانت - هوف تعیین می‌شود (جدول ۶).

جدول ۶ مقادیر ترمودینامیکی به‌دست آمده برای برهم‌کنش HSA و BSA با BSATP-AgNPs در دماهای متفاوت

نمونه	T(K)	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (J mol ⁻¹)
HSA	۲۸۸	-۲۸٫۷۱	-۹۷٫۵۷ ± ۹٫۹۷	-۲۳۸٫۳۴ ± ۴٫۰۳
	۲۹۸	-۲۶٫۹۶		
	۳۱۰	-۲۳٫۴۷		
BSA	۲۸۸	-۳۹٫۴۳	-۳۱٫۱۵ ± ۶٫۶۱	۲۹٫۰۷ ± ۱٫۴
	۲۹۸	-۳۹٫۹۶		
	۳۱۰	-۴۰٫۰۸		

در این معادله K_{SV} ثابت خاموشی استرن - ولمر (خاموشی استاتیک)، V ثابت خاموشی دینامیک، F_0 و F به ترتیب شدت فلورسانس در نبود و بودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs است. غلظت $[Q]$ و NPs رسم تغییرات F_0/F بر حسب $\exp(V[Q])$ در گستره ویژه‌ای از غلظت خطی است که شیب خط K_{SV} است. مقدار V (ثابت خاموشی دینامیک) با $[F_0/F]^{-1}$ $\exp(V[Q])$ در مقابل $[Q]$ توسط تغییر V تا دستیابی یک منحنی خطی محاسبه شد. مقدار V و K_{SV} در دماهای ۲۸۸، ۲۹۸، ۳۱۰، کلون به‌دست آمد. داده‌های جدول ۴ مشخص می‌کند که به احتمال سازوکار خاموشی با BSATP AgNPs، خاموشی استاتیک است، چراکه K_{SV} با افزایش دما کاهش یافته و V نشان‌دهنده ثابت خاموشی دینامیک با افزایش دما، افزایش یافته است.

جدول ۴ مقادیر محاسبه‌شده ثابت خاموشی و ثابت سرعت خاموشی HSA و BSA با نانوذره‌های BSATP AgNPs در دماهای متفاوت و $\text{pH} = 7.4$

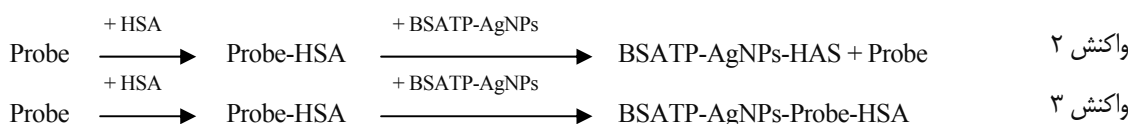
نمونه	T(K)	$K_i (M^{-1} S^{-1}) \times 10^{12}$	$K_{sv} (M^{-1}) \times 10$	R^2
HSA	۲۸۸	۹٫۹۶	۴٫۹۸	۰٫۹۸
	۲۹۸	۲٫۶۰	۱٫۳۰	۰٫۹۷
	۳۱۰	۱٫۸۶	۰٫۹۳	۰٫۹۲
BSA	۲۸۸	۱۱٫۴۶	۵٫۸۳	۰٫۹۸
	۲۹۸	۷٫۸۸	۳٫۸۹	۰٫۹۸
	۳۱۰	۵٫۵۲	۲٫۷۶	۰٫۹۹

ثابت پیوند و تعداد جایگاه‌های پیوند برای برهم‌کنش BSATP-AgNPs با HSA و BSA می‌تواند از اطلاعات و داده‌های خاموشی فلورسانس مطابق با معادله ۴ به‌دست آید. در این معادله F_0 و F به ترتیب شدت نشر فلورسانس HSA و BSA در نبود و بودن BSATP-AgNPs، n استوکیومتری پیوند و $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده (BSATP-AgNPs) هستند.

مراحل پیوند و مشارکت در پایداری کمپلکس-BSATP-BSATP-AgNPs و نقش بزرگی را ایفا می کنند.

بررسی موقعیت پیوند نانوذره های BSATP-AgNPs با HSA و BSA با نشان دهنده های جایگاه

به منظور شناسایی جایگاه پیوند BSATP AgNPs بر HSA و BSA آزمایش های نشان دهنده جایگاه رقابتی انجام شده است. از وارفارین و ایوپروپون که به طور ویژه به ترتیب در جایگاه های I و II در HSA و BSA متصل می شوند به عنوان نشان دهنده جایگاه استفاده می شوند [۳۴]. نشان دهنده های جایگاه پیوند I وارفارین، فنیل بوتازون و آزاپروپازون هستند. نشان دهنده های جایگاه II ایوپروپون، فلوفنامیک اسید و کتوپروپون است. جایگزینی پروپ های ویژه HSA و BSA با BSATP AgNPs می تواند ویژگی و قدرت نسبی پیوند به دو جایگاه را مشخص سازد. وقتی دو لیگاند (پروپ و نانوذره های نقره BSATP-AgNPs) به HSA و BSA به طور همزمان متصل می شوند. دو نوع برهم کنش ممکن است رخ دهد [۴۰].

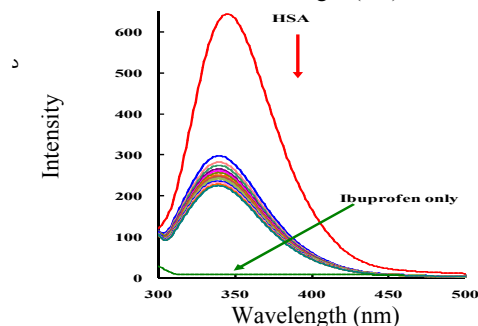
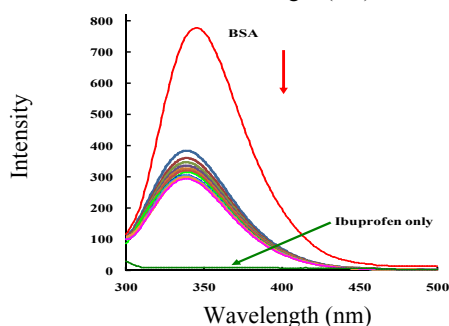
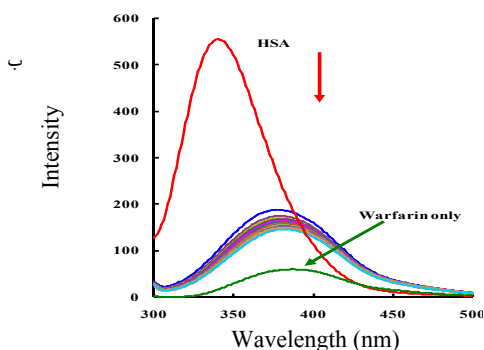
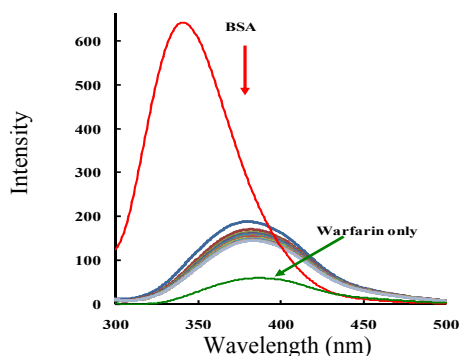


نشان دهنده جایگاه) در گستره ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شد (شکل ۸). بر پایه جدول ۷، تغییرات ثابت پیوند نانوذره به HSA در حضور وارفارین نسبت به ایوپروپون بیشتر است که نشان می دهد نانوذره با جایگاه I و زیر گروه IIA پیوند برقرار کرده است. همچنین، تغییرات ثابت پیوند نانوذره به BSA در حضور ایوپروپون بیشتر است. بنابراین، نانوذره های نقره عامل دار شده با جایگاه II و زیر گروه IIIA برهم کنش داشته است.

شیب مثبت نشان دهنده آن است که فرایند تشکیل کمپلکس در گستره دمایی مورد مطالعه گرمازا است. مقادیر محاسبه شده توابع ترمودینامیکی در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به اینکه برای HSA در این مطالعه $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 < 0$ است، گمان می رود که برهم کنش اصلی بین HSA و BSATP-AgNPs پیوند هیدروژنی و نیروی ضعیف واتدروالس بوده است [۳۴].

برای BSA در این مطالعه $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 > 0$ است. با توجه به قوانین خلاصه شده توسط رأس و سابرامنیام [۲۶]، از آنجا که محلول آبی کمپلکسی از BSATP-AgNPs و BSA را شکل می دهد، مقدار مثبت ΔS^0 بیانگر آب گریز بودن برهم کنش این دو ترکیب است. زیرا مولکول های آب که در اطراف لیگاند و پروتئین منظم شده اند یک پیکربندی تصادفی را به دست آورده اند. از طرفی مقدار منفی ΔH^0 می تواند به طور پایه ای به پیوند هیدروژنی نسبت داده شود. بنابراین، برهم کنش های آب گریز و پیوندهای هیدروژنی در

از خاموشی فلئوئورسانس HSA و BSA پس از افزودن BSATP AgNPs به سامانه Probe و BSA (و یا HSA) بر BSATP-AgNPs. می توان جایگاه پیوند Probe-BSA و HSA-Probe را تعیین کرد. هنگامی که نانوذره های نقره در رقابت با نشان دهنده های جایگاه در پیوند به پروتئین هستند می تواند ثابت پیوند را تحت تأثیر قرار دهند. محلول BSATP AgNPs به داخل سیستم HSA و BSA و نشان دهنده جایگاه افزوده می شوند، سپس طیف فلئوئورسانس مخلوط سه جزیی (BSATP-AgNPs) - پروتئین -



شکل ۸ اثر نشان دهنده‌های جایگاه (وارفارین و ایبوپروفن) بر خاموشی HSA (الف و ج) و BSA (ب و د) با نانوذره‌های BSATP-AgNPs در گستره غلظت پروفن و وارفارین برابر با $(1 \times 10^{-5} - 0.1)$ مولار و غلظت سرم آلبومین انسانی و گاوی برابر با 3×10^{-5} مولار است. طول موج تحریک ۲۹۰ نانومتر در دمای ۲۹۸ کلوین

جدول ۷ ثابت پیوند HSA و BSA در شرایط آزمایشگاهی مشابه به منظور مقایسه نشان دهنده‌های جایگاه (وارفارین و ایبوپروفن) در دمای ۲۹۸ کلوین و $pH=7.4$

نمونه	نشان دهنده جایگاه	$\log K_r$	$K_r \times 10^6 (M^{-1})$	n	R^2
HSA	-	۵٫۲۲	۵٫۴۰	۰٫۸۶	۰٫۹۹
	ایبوپروفن	۳٫۱۸	۳٫۱۸	۱٫۱۰	۰٫۹۸
	وارفارین	۰٫۵۶	۰٫۵۶	۰٫۹۹	۰٫۹۷
BSA	-	۷٫۱۲	۱۳٫۲۹	۱٫۶۲	۰٫۹۸
	ایبوپروفن	۶٫۹۵	۹٫۰۰	۰٫۸۳	۰٫۹۸
	وارفارین	۷٫۰۸	۱۲٫۱۸	۱٫۱۷	۰٫۹۶

در معادله ۱۱، $F(\lambda)$ شدت فلورسانس تصحیح شده دهنده در گستره طول موج (λ تا $\lambda + \Delta\lambda$) و $\varepsilon(\lambda)$ ضریب برانگیختگی مولار پذیرنده در طول موج (λ) است. در محاسبه بهره انتقال انرژی (E) نسبت غلظت مولار BSATP-AgNPs به آلبومین سرم ۱:۱ است. در این محاسبه‌ها K^2 برابر با $2/3$ ، ϕ برابر با 0.15 (برای HSA) و 0.19 (برای BSA) و N برابر با 0.336 است که در این فاصله انتقال انرژی انجام می‌شود. مقدار r در $R_0 < r < 1.5 R_0$ مشخص کننده انتقال انرژی بین HSA و BSA با BSATP-AgNPs است [۴۱]. مطابق با محاسبه‌ها مقدار r کمتر از 8 نانومتر بود که دلیل بر وجود سازوکار خاموشی استاتیک در خاموشی نشر BSATP-AgNPs با افزودن BSA و HSA است.

جدول ۸ عامل‌های انتقال انرژی برای پیوند نانوذره‌های

BSATP-AgNPs با HAS و BSA

ترکیبات	r (nm)	R_0 (nm)	$E \times 10^3$	J ($\text{cm}^6 \text{mmol}^{-1} 10^{-14}$)
BSATP-AgNPs-HSA	۱,۶۴	۲,۷۹	۰,۹۸	۰,۰۴۷
BSATP-AgNPs-BSA	۳,۰۴	۴,۸۲	۴,۱۳	۰,۰۴۷

BSA و HSA با BSATP-AgNPs برهم‌کنش CD

دورنگ‌نمایی دورانی مطالعه طیف

CD یک روش حساس برای مشاهده تغییر صورت‌بندی پروتئین در نتیجه برهم‌کنش با مولکول کوچک است. HSA دو نوار 208 و 222 نانومتر در طیف CD دارد. هر دو پیک منفی 208 نانومتر و 222 نانومتر، ناشی از انتقال π به π^* برای پیوندهای پپتیدی از ماریچ α هستند. با افزودن BSATP-AgNPs به محلول HSA و BSA شدت نوارهای طیف CD کاهش یافت (شکل ۹).

بررسی انتقال انرژی بین BSATP-AgNPs با HSA و BSA انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس^۱ FRET یک فرایند انتقال انرژی از مولکول نشرکننده در یک حالت غیربرانگیخته به یک مولکول همسایه آن از راه برهم‌کنش دوقطبی-دوقطبی غیرتابشی است. رایج‌ترین کاربرد FRET محاسبه فاصله پیوند بین دو جایگاه در درشت‌مولکول‌ها و تخمین جهت‌گیری لیگاندهای نشرکننده و پذیرنده است. انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس هنگامی روی می‌دهد که طیف فلورسانس نشرکننده (دهنده) با طیف جذبی دیگر مولکول (پذیرنده) همپوشانی کند. برپایه نظریه انتقال انرژی غیرتابشی فورستر بهره انتقال انرژی وابسته به گستره همپوشانی طیف نشری دهنده (HSA و BSA) با طیف جذبی پذیرنده (BSATP-AgNPs)، جهت‌گیری نسبی دهنده و پذیرنده به صورت دو قطبی و فاصله بین دهنده و پذیرنده، کمتر از 7 نانومتر است [۴۱]. انتقال انرژی مربوط به فاصله R_0 بین دهنده و پذیرنده با معادله ۹ به‌دست آمد.

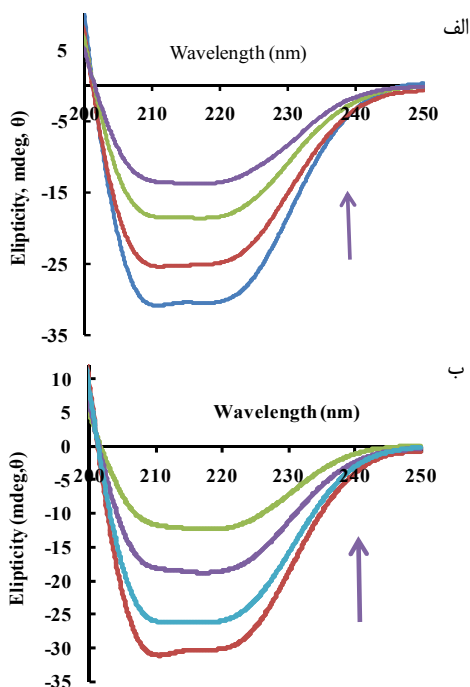
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (9)$$

که در آن، r فاصله لیگاند تا باقی‌مانده تریپتوفان پروتئین، R_0 فاصله بحرانی (وقتی بهره انتقال 50% باشد)، F و F_0 شدت فلورسانس در نبودن و بودن غلظت 1 به 1 خاموش کننده است. R_0 از معادله 10 به‌دست آمد. در این معادله K^2 عامل جهت‌گیری فضایی بین نشر دو قطبی دهنده و جذب دوقطبی از پذیرنده، N ضریب شکست محیط، ϕ بهره کوانتمی فلورسانس دهنده و J انتگرال همپوشانی طیف نشری دهنده و طیف جذبی پذیرنده است. J از معادله ۱۱ به‌دست آمد.

$$R_0^6 = 8.73 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J \quad (10)$$

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (11)$$

1. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)



شکل ۹ پیک‌های دورنگ‌نمایی دورانی محلول $10^{-6} \times$ ۳ مولار از HSA (الف) و BSA (ب) در نبود و بودن ۳ مولار در BSATP-AgNPs (5.4×10^{-6} - ۰/۱۰) مولار در دمای ۲۹۸ کلوین و $pH = 7.4$

جدول ۹ تغییرهای درصد مارپیچ آلفا HSA و BSA در حضور مقادیر متفاوت نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs

α -helix (%)		[BSATP-AgNPs]/[HSA] یا [BSA]
HSA	BSA	
۴۳,۷۶	۴۹,۳۰	۰/۰
۳۳,۵۸	۳۴,۴۷	۱/۰
۲۰,۸۵	۱۹,۷۸	۱/۴
۱۰,۹۸	۹,۸۶	۱/۸

مدل‌سازی مولکولی برهمکنش HSA و BSA با BSATP-AgNP
به منظور شفاف‌سازی برهم‌کنش 4-BSATP-BSATP-AgNPs با HSA و BSA مطالعه مدل‌سازی مولکولی انجام

نتایج CD در عبارت میانگین بیضوی بودن^۱ باقی‌مانده (MRE) در $deg \text{ cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ برپایه معادله ۱۲ بیان می‌شود.

$$MRE = \theta_{\text{Obs}} / (10 \ln C_p) \quad (12)$$

θ_{Obs} دورنگ‌نمایی دورانی مشاهده‌شده بر حسب میلی‌درجه، n تعداد باقیمانده‌های آمینو اسید (۵۸۵ برای HSA و ۵۸۳ برای BSA) طول مسیر سل یک سانتی‌متر و C_p غلظت مولار است. مقدار پیش‌ α محاسبه‌شده بر پایه تغییر مقدار BSATP-AgNPs در ۲۰۸ نانومتر از معادله ۱۳ توسط گرینفیلد و فازمن تعیین شده است [۴۲].

$$-\text{helix}(\%) = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \quad (13)$$

در این معادله MRE_{208} مقدار MRE مشاهده‌شده در ۲۰۸ نانومتر، ۴۰۰۰ مقدار MRE شکل- β و صورت‌بندی مارپیج تصادفی عبور کرده در ۲۰۸ نانومتر و ۳۳۰۰۰ مقدار MRE از یک مارپیج α خالص در ۲۰۸ نانومتر است. نتایج نشان داد که سیگنال CD از HSA بدون جابه‌جایی در پیک برپایه افزایش غلظت BSATP AgNPs افزایش یافته است. افزایش سیگنال CD به سبب افزایش محتوی ساختار ثانویه مارپیج آلفا است. مقدار مارپیج آلفا در ساختار ثانویه HSA با معادله ۱۳ محاسبه می‌شود. با افزایش غلظت BSATP-AgNPs مقدار مارپیج آلفا محاسبه‌شده افزایش یافت (جدول ۹). این افزایش نشان می‌دهد که پیوند BSATP-AgNPs به HSA عامل ایجاد تغییر صورت‌بندی HSA بوده است.

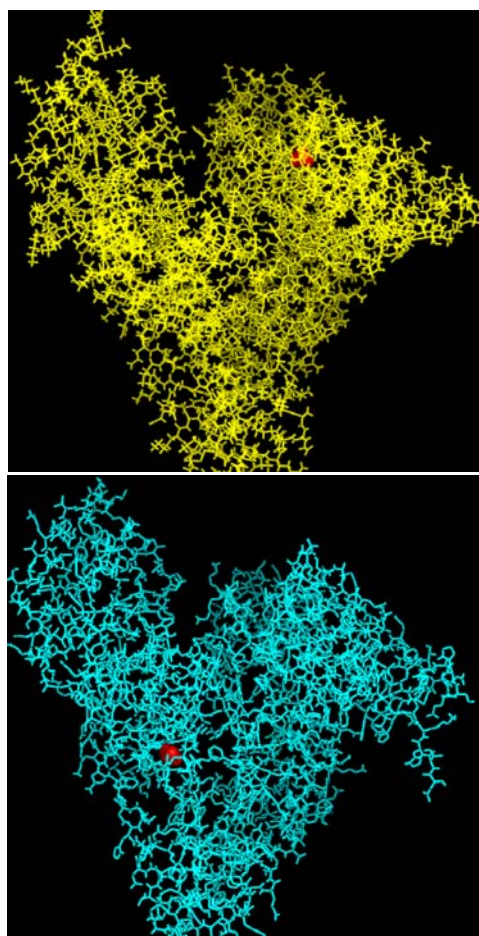
1. Ellipticity

نتیجه گیری

مولکول BSATP-AgNPs برهم کنشی با DNA برقرار می کند که با روش های متفاوت سازوکار این برهم کنش بررسی و مشخص شد که یک برهم کنش الکترواستاتیک در شیارهای کوچک DNA است. پیک جذبی کمتر از ۷ نانومتر دارد که دلیل بر پیوند شیاری است. تغییرهای بسیار اندک در مقدار گرانروی نشان می دهد که BSATP-AgNPs پیوند در بخش شیاری DNA برقرار کرده است. نتایج CD نشان داد که با افزایش BSATP-AgNPs تغییرهای صورت بندی در مارپیچ DNA رخ می دهد. شدت نوار منفی افزایش و نوار مثبت کاهش یافت که نشان دهنده پیوند شیاری است. نتایج محاسبه های کامپیوتری داکینگ نشان داد که BSATP-AgNPs در محل شیارهای کوچک با DNA پیوند دارد. مطالعه اثر قدرت یونی، یک کاهش در شدت پیک جذبی فرابنفش-مرئی محلول BSATP-AgNPs و DNA را نشان داد که تایید کننده نوع پیوند الکترواستاتیک است. در محاسبه ثابت پیوند BSATP-AgNPs با DNA به روش طیفسنجی جذبی، مقدار K_b به دست آمده $(1.44 \times 10^5 M^{-1})$ با مقادیر گزارش شده پیونددهنده های الکترواستاتیک و شیاری همخوانی دارد. مقادیر به دست آمده آنتالپی ($\Delta H^0 < 0$) و آنتروپی ($\Delta S^0 > 0$) تایید کرد که نیروی اصلی پیوند BSATP-AgNPs با DNA نیروی الکترواستاتیک است.

با روش های متفاوت مشخص شد که BSATP-AgNPs در HSA در مکان I زیر گروه IIA و در BSA در مکان II پیوند برقرار کرده است. کاهش شدت پیک جذبی فرابنفش-مرئی در حضور مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs نیز نشان دهنده وجود برهم کنش بین BSATP-AgNPs با BSA و HSA است. بررسی خاموشی فلورسانس HSA و BSA با افزودن BSATP-AgNPs نشان داد که هر دو سازوکار خاموشی

شد. هدف این ترویج فهم بصری از جایگاه پیوند در سطح مولکولی بود. مطابق با مدل سازی مولکولی انجام شده، پایدارترین صورت بندی با کمترین انرژی پیوند برای مشخص کردن جایگاه پیوند BSATP-AgNPs به HSA و BSA به کار رفت. همان طور که مشاهده می شود BSATP-AgNPs در HSA در مکان I زیر گروه IIA و در BSA در مکان II شکل قرار گرفته است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰ صورت بندی به دست آمده برای برهم کنش بین HSA (الف) و BSA (ب) با BSATP Ag NPs از بهینه سازی با مدل سازی مولکولی داکینگ است. جایگاه پیوند مشخص شده مربوط به BSATP-AgNPs به رنگ قرمز نشان داده شده است.

فاصله ۴/۸۲ نانومتر برای BSA از راه محاسبه به دست آمد. مطالعه طیف‌های CD مربوط به HSA و BSA نشان داد که با افزودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs شدت پیک‌ها در طیف و درصد مارپیچ α محاسبه شده افزایش می‌یابد که دلیلی بر تغییر صورت‌بندی HSA و BSA در اثر برهم‌کنش است. مدل‌سازی مولکولی نیز موید پیوند BSATP-Ag NPs به HSA در مکان I زیر گروه HIA و پیوند به BSA در مکان II است.

استاتیک و دینامیک در خاموشی فلورسانس تاثیرگذار بودند. ثابت پیوند محاسبه‌شده از روش فلوروسانس برای HSA و BSA به ترتیب $1.0^5 \times 10^7$ و $1.0^7 \times 10^6$ بود. عامل‌های ترمودینامیکی مشخص کرد که برهم‌کنش اصلی بین HSA و BSATP-AgNPs پیوند هیدروژنی و نیروی ضعیف واتدروالس بوده است و در پایداری کمپلکس BSATP-AgNPs و BSA برهم‌کنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی در مراحل پیوند و مشارکت نقش بزرگی را ایفا می‌کنند. در مطالعه‌های انتقال انرژی فلوروسانس، فاصله پیوند ۲/۷۹ نانومتر برای HSA و

مراجع

- [1] Opar, A; Nat. Rev. Drug Discov. 8(6), 437-8, 2009.
- [2] Yezhelyev, M.V; Gao, X.; Xing, Y.; Al-Hajj, A.; Nie, S.; O'Regan, R.M.; Lancet Oncol. 7, 657-667, 2006.
- [3] Choi, Y.H; Han, H.K.; J. Pharm. Investig. 48, 43-60, 2018.
- [4] CHAN, H.K.; Adv. Drug Deliver. Rev. 63(6), 405-40, 2011.
- [5] Russell, A.D.; Hugo, W.B.; "7 Antimicrobial activity and action of silver", Progress in Medicinal Chemistry, Elsevier, UK, 1994.
- [6] Lee, S.H.; Jun, B.H.; Int. J. Mol. Sci. 20, 865-889, 2019.
- [7] Chugh, H.; Sood, D.; Chandra, I.; Tomar, V.; Dhawan, Chandra, G.; Artif. Cells Nanomed. Biotechnol, 46, 1210-1220, 2018.
- [8] Ravindran, A.; Chandran, P.; Khan, S.S.; Colloids Surf. B 105, 342-352, 2013.
- [9] Basu, S.; Jana, S.; Pande, S.; Pal, T.; J. Colloid Interface Sci. 321, 288-293, 2008.
- [10] Zheng, J.; Wu, X.; Wang, M.; Ran, D.; Xu, W.; Yang, J.; Talanta 74, 526-532, 2008.
- [11] Rutkauskas, K.; Zubrienė, A.; Tumosienė, I.; Kantminienė, K.; Kažemėkaitė, M.; Smirnov, A.; Kazokaite, J.; Mourkunaite, V.; Capkauskaitė, E.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Zigmuntas, J.B.; Matulis, D.; Anhydrases Molecules 19, 17356-17380, 2014.
- [12] Kalgutkar, A.S; JONES, R.M.; Sawant, A; "Sulfonamide as an essential functional group in drug design (Chap. 5)" in "Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET, Edited by Dennis, A.S.", Royal Society of Chemistry, UK, 2010.
- [13] Kordestani, D.; Ph.D Thesis, Razi University, Kermanshah, Iran, 2013.
- [14] Akdi, K.; Vilaplana, R.A.; Kamah, S.; González-Vilchez, F.; J. Inorg. Biochem. 99(6), 1360-1368, 2005.
- [15] Amendola, V.; Bakr, O.M.; Stellacci, F.; Plasmonics 5(1), 85-97, 2010.
- [16] Asker, F.W; Mahamad, Z.Z.; Eliwei, A.G.; Nief, O.A; Int. J Appl. Chem. 13(2), 169-177, 2017.
- [17] Başar, E; Tunca, E; Bülbül, M; Kaya, M; J Enzyme Inhib. Med. Chem. 31(6), 1356-1361, 2016.
- [18] Liu, Z.C.; Wang, B.D.; Yang, Z.Y.; Li, Y.; Qin, D.D.; Li, T.R.; Europ J Med. Chem. 44, 4477-4484, 2009.
- [19] Shahabadi, N.; Amiri, S.; Zhaleh, H.; J Coord. Chem. 73, 1-17, 2020.

- [20] Shi, S.; Liu, J.; Li, J.; Zheng, K.C.; Huang, X.M.; Tan, C.P.; Chen, L.M.; Ji, L.N.; *J. Inorg. Biochem.* 100, 385-395, 2006.
- [21] Kumar, K.A.; Reddy, K.L.; Satyanaryana, S.; *Transit. Metal Chem.* 35, 713-720, 2010.
- [22] Wolfe, A.R.; Meehan, T.; *Nucleic Acids Res.* 22, 3147-3150, 1994.
- [23] Jalali, F.; Dorraji, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 598-601, 2012.
- [24] Kashanian, S.; Zeidali, S.H.; *DNA Cell Biol.* 30, 499-505, 2011.
- [25] Lakowicz, J.R.; "Principles of fluorescence spectroscopy 2nd Ed.", Springer, USA, 2013.
- [26] Ross, P.D.; Subramanian, S.; *Biochemistry* 20, 3096-3102, 1981.
- [27] Sahabadi, N.; Maghsudi, M.; *Dyes and Pigm.* 96(2), 377-382, 2013.
- [28] Patra, A.K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A.R.; *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101(2), 233-244.
- [29] Ahmadi, F.; Alizadeh, A.A.; Bakhshandeh, F.; Jafari, B.; Khodadadian, M.; *Food Chem. Toxicol.* 48(1), 29-36, 2010.
- [30] Yang, H.; Xing-Ming W.; *J. Mol. Struct.* 1036, 51-55, 2013.
- [31] Freifelder, D.M.; "Physical biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology", 2nd Edition, Amazon Book, USA, 1982.
- [32] Silverman, R.B.; Holiaday, M.W.; *The organic chemistry of drug design and drug action.* Academic press, 2014.
- [33] Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.* 18(3), 291-309, 2001.
- [34] Shahabadi, N.; Hadidi, S.; Feizi, F.; *Spectrochimica Acta A* 138, 169-175, 2015.
- [35] Abou-Zied, O.K.; Al-Shishi, O.I.K.; *J. Am. Chem. Soc.* 130 (32), 10793-10801, 2008.
- [36] Permyakov, E.A.; *Luminescent spectroscopy of proteins*, CRC Press, USA, 1992.
- [37] Keizer, J.; *J. Am. Chem. Soc.* 105, 1494-1498, 1983.
- [38] Eftink, M.R.; Ghiron, C.A.; *Biochemistry* 16(25), 5546-5551, 1977.
- [39] Boaz, H.; Rollefson, G.K.; *J. Am. Chem. Soc.* 72(8), 3435-3443, 1950.
- [40] Dufour, C.; Dangles, O.; *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*, 1721(1), 164-173, 2005.
- [41] Förster, T.; *J. Biomed. Optics* 17(1), 0110021-01100210, 2012.
- [42] Greefield, N.J.; Fasman, G.D.; *Biochemistry* 8(10), 4108- 4116, 1969.

Preparation and identification of 4- benzenesulfonamidethiophenol grafted on silver nanoparticles and binding studies with calf thymus DNA, human serum albumin and bovin serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods

Fereshteh Amiri¹, Marzieh Sadeghi^{2,*}, Tahereh Shokri³

1. M.Sc. of Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Khoy, Iran.
2. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran.
3. M.Sc. Student of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran.

Abstract: In this article, silver nanoparticles capped with 4-benzenesulfonamideaminothiophenol (BSATP-AgNP) were synthesized. The formation of synthesized nanoparticles was characterized by UV-Vis spectroscopy, FTIR, TEM, and NMR. The interactions between the silver nanoparticles with calf-thymus DNA, human serum albumin (HAS) and bovine serum albumin (BSA) were investigated by UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, viscosity measurements, and molecular docking studies. Circular dichroism data showed that binding of BSATP-AgNPs to DNA resulted in changes in the structure and conformation of DNA. This indicates a minor groove mode of binding. Fluorimetric studies showed a decrease in fluorescence intensity of the BSATP-AgNPs in the presence of increasing amounts of DNA solution. The results of CD data indicate that the conformation of HSA and BSA molecules is changed significantly in the presence of BSATP-AgNPs. The negative ΔH and ΔS values indicate that the main interactions between BSATP-AgNPs and HSA were hydrogen bonding and weak van der Waals forces. The results of the site marker competitive experiment confirmed that the BSATP AgNPs can bind to HSA located within site I (subdomain IIA) and BSA within site II. The experimental results were in agreement with the results obtained via a molecular docking study. This study provided important insight into the interaction of BSATP-AgNPs with DNA and serum albumin, facilitating further investigation on the pharmacological behavior of BSATP-AgNPs.

Keywords: BSATP functionalized silver nanoparticles, DNA, Human serum albumin, Bovine serum albumin, Spectroscopic studies, Molecular docking