بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به پدر ومادر عزیزم که روشنایی زندگانیم هستند.

تقدیم به همسر عزیزم که همراه همیشگیم در فراز و نشیبهای زندگی است.

و به فرزندان دلبندم که بهانه زیستنم هستند.

تقدیر و تشکر

با سپاس از استاد ارجمند جناب آقای دکتر غلامرضا دهقان که در تمام مراحل این کار پژوهشی از راهنمائی های ارزنده ایشان بهره مند بوده ام .

با تشکر از جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی که از تجربه ،دانش و راهنمائی های ایشان برخوردار بوده ام.

با تشکر از جناب آقای دکتر ابوالقاسم جویبان استاد مشاور محترم و جناب آقای دکتر زعفرانی معطر که امکانات آزمایشگاه هایشان را در اختیار اینجانب قراردادند.

با تشکر از سرکار خانم دکتر معصومه شقاقی و سرکار خانم دکتر زهره شقاقی که وقت ذیقیمتشان را برای کمک به این کار تحقیقاتی در اختیار من گذاشتند.

و باتشکر فراوان از دوست بسیار عزیزم سرکار خانم میترا آروین که در تمام مراحل انجام این پروژه از همیاری ، تجربه و دانش ایشان استفاده نموده ام.

دانشکده علوم

گروه علمی زیست‌شناسی

عنوان پایان نامه:

سنتز و بررسی میانکنش کمپلکس دفراسیروکس -Tb^{3+} با DNA دو رشته

نگارش:

پریسا سیستانی

اساتید راهنما:

دکتر غلامرضا دهقان

دکتر رضا حاجی حسینی

استاد مشاور:

دکتر ابوالقاسم جویبان

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی

بهمن ۱۳۹۰

چکیده:

آهن عنصری است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مهم شرکت می‌کند اما آهن مازاد کمپلکس‌های نامحلولی را تشکیل می‌دهد که در اندام‌های داخلی ذخیره شده و باعث آسیب آن‌ها می‌شود.

بیماری‌هایی مانند β- تالاسمی و سندرم میلودیسپلاستیک که برای درمان نیاز به تزریق مکرر خون دارند می‌توانند باعث انباشتگی آهن در بدن شوند.

جذب آهن در دستگاه گوارش (معده و روده) معمولا ۱/۵-۱ mg/day است. به دلیل عدم توانایی بدن در حذف آهن به جز از طریق مکانیسم‌هایی محدود، اختلال در هموستازی طبیعی بدن باعث افزایش آهن برای تشکیل کمپلکس‌های نامحلول با فریتین می‌شود که در طحال، کبد و عضله قلب ذخیره می‌گردد.

دفراسیروکس یک داروی جدید خوراکی است که جهت درمان انباشتگی آهن در دوز یک بار در روز به کار می‌رود و توسط اداره غذا و داروی آمریکا در نوامبر ۲۰۰۵ تایید شده است.

دفراسیروکس توانایی تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های فلزی مختلف نظیر Tb^{3+} را دارد. کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} بسیار پایداراست و شدت جذب فلورسانس بالایی دارد بنابر این می‌توان از این کمپلکس به عنوان پروب در این تحقیق استفاده کرد.

در سال‌های اخیر، پژوهشگران زیادی بر موضوع میان کنش مولکول‌های کوچک با DNA تمرکز کرده‌اند. DNA عموما اولین هدف داخل سلولی داروهای ضد سرطان است به طوری که میان کنش بین مولکول‌های کوچک و DNA می‌تواند باعث آسیب DNA در سلول‌های سرطانی و متوقف شدن تقسیم سلول‌های سرطانی و نهایتا مرگ آن سلول‌ها شود.

در این کار تحقیقی، کمپلکس دفراسیروکس با یون‌های Tb^{3+} سنتز شده و با روش‌های اسپکتروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین میانکنش این کمپلکس با CT-DNA با استفاده از طیف ماوراء بنفش- مرئی، دو رنگ نمایی دورانی (CD)، ولتامتری چرخه‌ای (CV)، ویسکوزیمتری و طیف سنجی فلورسانس رقابتی مورد مطالعه قرار گرفته است.

اتصال DNA به کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} باعث اثر هایپرکرومیک در طیف ماوراء بنفش- مرئی می‌شود، علاوه بر این میزان پایین ثابت اتصال DNA به کمپلکس ($۱/۸ \times ۱۰^{٤}$)، روشن می کند که کمپلکس به DNA از طریق غیر درج شونده متصل می شود. کاهش شدت هر دو باند طیف دو رنگ نمایی دورانی CT-DNA که مربوط به آشفتگی در ساختار دوم آن می باشد وکاهش ویسکوزیته

نیزدلیل بر اتصال به صورت غیر درج شونده است و باعث تایید طیف های جذبی می شوند. علاوه بر این، مطالعه رقابتی با طیف سنجی فلورسانس با استفاده از متیلن بلو نیز نشان می‌دهد که کمـپلکس از طریق اتصال غیر درج شونده به DNA متصل شود. همچنین در ضمن اضافه کردن DNA به کمپلکس، پتانسیل پیک‌های آندی و کاتدی و میانگین آن‌ها شیفت منفی نشان می‌دهند .این شیفت منفی نشانگر آن است که کمپلکس از طریق اتصال به سطوح خارجی با CT-DNA بر هم کنش می یابد.این نتایج همه بیانگر این است که میان کنش بین کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} و CT-DNA از طریـق اتصـال بـه سطوح خارجی است.

کلمات کلیدی:

CT- DNA، کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+}، طیف سنجی، ویسکوزیمتری

فهرست

عنوان صفحه

فصل اول (کلیات)

۱- مقدمه و بیان مسئله ۲
۱-۱ بیماری β- تالاسمی و انباشتگی آهن در بدن ۲
۱-۲ بررسی خواص فلورسانس داروی دفراسیروکس و کمپلکس آن با یون‌های لانتانید ۷
۱-۲-۱ خواص فلورسانس یون‌های Tb^{3+} ۱۰
۱-۳ ساختمان DNA ۱۱
۱-۳-۱ ترکیب شیمیائی و ساختمان اول ۱۱
۱-۳-۲ ژئومتری فضایی و ساختمان دوم ۱۲
۱-۳-۳ نیروهای پایدار کننده ساختمان دوم DNA ۱۳
۱-۳-۳-۱ برهم کنش‌های هیدروژنی ۱٤
۱-۳-۳-۲ برهم کنش‌های استکینگ ۱٤
۱-۳-۳-۳ نیروهای داخل و بین اسکلت با طیف وسیع ۱٤
۱-۳-٤ میدان الکترواستاتیک DNA ۱۵
۱-۳-۵ پلی مورفیسم ۱۵
۱-۳-٦ ساختمان نوع سوم ۱۸
۱-۳-۷ ابر پیچ خوردگی ۱۹
۱-٤ تکنیک‌های به کار رفته در مطالعه ساختمان DNA ۱۹
۱-۵ بررسی برهم کنش DNA با ملکول‌های کوچک ۲۱
۱-۵-۱ برهم کنش DNA با آب ۲۱

۱-٦ ویژگی‌های کلی در تشخیص و میان کنش دارو و مولکول‌های کوچک با DNA..... ۲۲
۱-٦-۱ اتصال از نوع درج شونده..... ۲۳
۱-٦-۲ درج شونده‌های ساده..... ۲۵
۱-٦-۳ درج شونده‌های پیچیده..... ۲٦
۱-٦-٤ درج شونده‌ها به شکاف بزرگ..... ۲۸
۱-٦-۵ درج شونده‌های دوتایی..... ۳۰
۱-٦-٦ اتصال از نوع درج شوندگی با ساختارهای DNA با درجات بالاتر..... ۳۱
۱-۷ مولکول‌های متصل شده به شکاف‌ها..... ۳۱
۱-۷-۱ مولکول‌های ساده متصل شونده به شکاف..... ۳۱
فصل دوم (مواد و روشها)
۲-۱ مواد مورد استفاده..... ۳٦
۲-۲ دستگاه‌های مورد استفاده..... ۳٦
۲-۳ تهیه بافر تریس- HCl..... ۳٦
۲-٤ تهیه محلول مادر دفراسیروکس..... ۳۷
۲-۵ محلول مادر تربیوم..... ۳۷
۲-٦ محلول CT- DNA..... ۳۷
۲-۷ سنتز کمپلکس دفراسیروکس- تربیوم (III)..... ۳۸
۲-۸ بررسی نحوه برهم کنش دفراسیروکس با یون تربیوم (III)..... ۳۸
۲-۹ مطالعه برهم کنش بین کمپلکس دفراسیروکس- تربیوم (III) با CT- DNA..... ۳۸
۲-۱۰ مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس..... ۳۹
۲-۱۱ طیف سنجی فلورسانس رقابتی..... ۳۹
۲-۱۲ مطالعه میان کنش بین کمپلکس دفراسیروکس- تربیوم (III) و DNA با روش طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی..... ٤۰
۲-۱۳ اندازه گیری ویسکوزیته..... ٤۰
۲-۱۳-۱ ویسکومتر مویی اوسوالد..... ٤۱
۲-۱٤ بررسی‌های الکتروشیمیائی (ولتامتری چرخه‌ای)..... ٤۲
فصل سوم (بحث و نتایج)

۳-۱ بررسی تشکیل کمپلکس بین دفراسیروکس و یون تربیوم ٤٤
۳-۱-۱ مطالعه برهم کنش بین دفراسیروکس و یون تربیوم (III) با طیف‌سنجی ماوراء بنفش- مرئی (UV-Vis) ٤٤
۳-۲ بررسی نوع میانکنش بین کمپلکس دفراسیروکس- Tbو CT- DNA تیموس گاوی (CT-DNA)... ..... ٤٥
۳-۲-۱ مطالعه برهم کنش بین کمپلکس دفراسیروکس-Tb و CT- DNA با روش طیف سنجی ماوراء بنفش- مرئی (UV- Vis) ٤٥
۳-۲-۱-۱ اثر DNA تیموس گاوی بر روی طیف اشعه ماوراء بنفش- مرئی کمپلکس دفراسیروکس-Tb ٤٧
۳-۲-۱-۲ بررسی تغییرات طیف جذبی CT- DNA در حضور کمپلکس ٤٧
۳-۳ مطالعات فلورسانس ٤٩
۳-۳-۱ بررسی فلورسانس دفراسیروکس با یون تربیوم (III) در محلول آبی ٤٩
۳-۳-۲ مطالعه میانکنش بین DNA و کمپلکس دفراسیروکس توسط فلورسانس ٥٢
۳-۳-۳ نتایج مطالعه میانکنش بین CT-DNA و کمپلکس دفراسیروکس- Tb توسط فلورسانس رقابتی ٥٤
۳-٤ اندازه‌گیری ویسکوزیته ٥٦
۳-٥ طیف‌سنجی دو رنگ نمایی دورانی ٥٨
۳-٦ بررسی رفتار الکتروشیمیایی کمپلکس دفراسیروکس-Tb در حضور و غیاب DNA (ولتامتری چرخه‌ای) ٦٠
۳-۷- نتیجه‌گیری ٦٢
۳-۸- پیشنهادات ٦٣
رفرانس‌ها ٦٤

فهرست جداول

فصل اول

جدول ۱-۱ سطوح انرژی و انتقالات لومینسانس برای Eu^{3+} و Tb^{3+} ۱۰
جدول ۱-۲ پارامترهای ساختمانی برای مدل‌های مختلف DNA ۱۷
جدول ۱-۳ زوایای کنفورماسیونی اسکلت برای مدل‌های مختلف DNA ۱۷

فهرست اشکال و نمودارها

فصل اول

شکل ۱-۱ A) مولکول دفراسیروکس B) پیوند دو مولکول دفراسیروکس با اتم آهن ٦
شکل ۱-۲ شمایی از سطوح انرژی تعدادی از یون‌های لانتانید ۸
شکل ۱-۳ طیف‌های لومینانس Eu^{3+} (a) و Tb^{3+} (b) ۱۰
شکل ۱-٤ نحوه اتصال نوکلئوتیدها به یکدیگر (A = T و G ≡ C)..... ۱۲
شکل ۱-۵ ویژگی‌های اصلی مارپیچ دو رشته ای DNA..... ۱۳
شکل ۱-٦ اشکال مختلف DNA (A و B و Z) ۱٦
شکل۱-۷ کنفورماسیون دو نوکلئوتید مجاور در یک رشته از Z- DNA..... ۱۸
شکل ۱-۸ ساختمان Z- DNA چپگرد با تاکید بر ناپیوستگی در اسکلت ۱۸
شکل ۱-۹ تصاویر میکروسکوپ الکترونی از DNA خطی و حلقوی ۲۰
شکل ۱-۱۰ تصاویر میکروسکوپ الکترونی از DNA مربوط به E. coli که ابر مارپیچی است که به طور منفی پیچ خورده است..... ۲۰
شکل ۱-۱۱ مولکول پروفلاوین که بر روی یک جفت باز قرار گرفته است..... ۲٤
شکل ۱-۱۲ درج شدگی یک مولکول داروی مسطح به DNA..... ۲٤
شکل ۱-۱۳ درج شونده‌های ساده (پروفلاوین- اتیدیوم- دائونوروبیسین و آدریامایسین) ۲٦
شکل ۱-۱٤ قرار گرفتن یون منیزیوم هیدراته در شکاف بزرگ ۲۷
شکل ۱-۱۵ درج شونده‌های پیچیده (داروی ضد سرطان دائونومایسین)..... ۲۷
شکل ۱-۱٦ درج شونده‌های پیچیده (اکتینومایسین D)..... ۲۸
شکل ۱-۱۷ درج شونده‌ها به شکاف بزرگ (ساختمان داروی ضد سرطان آکریدین DACA)..... ۲۹
شکل ۱-۱۸ درج شونده‌ها به شکاف بزرگ (ساختمان کریستالی کمپلکسی بین ۹- آمینو DACA و توالی d (CGTACG) از DNA)..... ۳۰

شکل ۱-۱۹درج شونده‌های دو تایی ۳۰
شکل ۱-۲۰ بعضی مولکول‌های متصل شونده به شکاف‌ها ۳۲
شکل ۱-۲۱ ساختمان کریستالی کمپلکسی بین Hoechst ۳۳۲۵۸ و دو رشته‌ای d (CGCAAATTTGCG) .. ۳۳
شکل ۱-۲۲ نمایش سطح دو رشته‌ای DNA دیکرسون- درو بانمایش شکاف کوچک ۳۳

فصل دوم

شکل ۲-۱ ساختار نشانگرهای فلورسانس اتیدیوم بروماید و متیلن بلو ٤٠
شکل ۲-۲ ویسکومتر اسوالد ٤٢

فصل سوم

شکل۳-۱ طیف جذبی ماوراء بنفش- مرئی دفراسیروکس و کمپلکس دفراسیروکس- تربیوم (III) ٤٤
شکل ۳-۲ طیف ماوراء بنفش- مرئی کمپلکس دفراسیروکس- تربیوم (III) ٤٧
شکل ۳-۳ طیف ماوراء بنفش- مرئی DNA تیموس گاوی در حضور افزایش غلظت کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} ٤٨
شکل ۳-٤ نمودار $(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ / [Complex] در مقابل [Complex] ٤٩
شکل ۳-٥ a) طیف UV در مقابل غلظت مولی سیستم دفراسیروکس- Tb^{3+} b) شدت فلورسانس در مقابل غلظت مولی سیستم دفراسیروکس- Tb^{3+} ٥٠
شکل ۳-٦ طیف تحریک و نشر فلورسانس Tb^{3+} و دفراسیروکس- Tb^{3+} ٥١
شکل ۳-۷ طیف نشری کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} با افزایش غلظت CT-DNA در دمای اتاق r_i = [CT-DNA] / [Complex] ... ۰، ۰/٥، ۱، ۱/۳، ۱/۴، ۱/٥ ..... ٥٢
شکل ۳-۸ نمودار استرن- ولمر، مربوط به خاموش‌سازی فلورسانس کمپلکس دفراسیروکس-Tb^{3+} توسط خاموش کننده CT-DNA ٥٣
شکل ۳-۹ نمودار $\log (F_0 - F) / (F - F_\infty)$ در مقابل log [Q] ٥٤
شکل ۳-۱۰ طیف نشری کمپلکس CT-DNA و متیلن بلو با افزایش غلظت کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} .. ٥٦
شکل ۳-۱۱ کاهش ویسکوزیته DNA در حضور افزایش غلظت کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} ٥٧
شکل ۳-۱۲ طیف CD مشاهده شده برای CT-DNA در بافر Tris HCl ٥٨
شکل ۳-۱۳ طیف دو رنگ نمایی دورانی DNA تیموس گاوی در حضور افزایش غلظت کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} ٥٩
شکل ۳-١٤ طیف ولتامتری چرخه‌ای برای کمپلکس دفراسیروکس- Tb^{3+} در حضور غلظت‌های مختلف DNA ٦١

فصل اول:

مقدمه

۱- مقدمه و بیان مسئله

۱-۱ بیماری β- تالاسمی و انباشتگی آهن در بدن

آهن عنصری اساسی است که در بسیاری از فرایندهـای فیزیولـوژیکی، از جملـه تولیـد انـرژی، تنفس میتوکندریائی وبه طور غیر مسـتقیم در سـنتز DNA شـرکت مـی‌کنـد [۲و۱]. جـذب آهـن در دستگاه گوارش (معده و روده) معمولاً mg/day ۱-۱/۵ است که این مقدار بـا کـاهش آهـن از طریـق مکانیسم های خاصی، متعادل می‌شود [۳]. بدلیل عدم توانایی بدن در حـذف آهـن بـه جـز از طریـق مکانیسم‌هایی گذرا ومحدود ، اختلال در هموستازی طبیعی بدن باعـث افـزایش آهـن بـرای تشـکیل کمپلکس‌های نامحلول با فریتین می‌شود که در طحال، کبد و عضله قلب ذخیره مـی‌گـردد. مکانیسـم قطعی آسیب این بافت‌ها توسط آهن اضافی هنوز شناخته نشده، ولی عقیده بر این است که مـی‌توانـد در اثر تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل به وسیله کمپلکس‌های آهـن باشـد کـه نهایتـاً باعـث آسـیب اکسیداتیو به پروتیئن‌ها و لیپیدهای غشایی می‌شود [۴]. به هر حال بین غلظت‌های آهن یـک انـدام و آسیب به آن اندام ارتباط مستقیم وجود دارد [۵ و ۳].

اختلال در تعادل آهن به وسیلهٔ دو مکانیسم اصلی صورت می‌گیرد. یکی افزایش جذب آهـن در دستگاه گوارش (معده و روده) به دنبال شرایطی مانند هموکروماتوسیس و کمبود اکسیژن در بافت قلبی است و دیگری افزایش دریافت آهن است که در تزریق خون برای معالجه‌ی کم خونیهـایی ماننـد β- تالاسمی، بیماری کم‌خونی سلول داسی شکل و سندرم میلو دیسپلاستیک[1] اتفاق می‌افتد [۶ و ۳].

میزان آهن کل بدن در یک انسان بالغ طبیعی در حدود ۵۰-۴۰ میلی‌گـرم بـه ازای هـر کیلـوگرم وزن بدن است [۷]. در حدود ۸۰٪ میزان آهن کل در هموگلوبین‌هـای سـلول‌هـای قرمـز خـون و در میوگلوبین ماهیچـه‌هـا یافـت مـی‌شـود و ۲۰٪ باقیمانـده در پـروتئین‌هـای ذخیـره‌ای مثـل فـریتین و هموسیدرین وجود دارد و مقدار کمی نیز در آنزیم‌های مختلف حاوی آهن و حـدود ۴-۳ میلـی‌گـرم نیز به صورت متصل به ترانسفرین در پلاسما وجود دارد. میانگین جذب آهن در روز ۳-۱ میلـی‌گـرم است و تقریباً همین مقدار نیز به وسیلهٔ تخریب سلول، از طریق روده و پوسـت و در زنـان در طـول سنین باروری از طریق قاعدگی و حاملگی دفع می‌گردد [۸].

انباشتگی آهن جدی‌ترین مشکل در بیماری β- تالاسمی است [۹]. هم چنین در بیمارانی کـه در مورد آنها تزریق خون انجام نمی‌گیرد، جذب غیرطبیعی آهن باعث افزایش میزان آهن بـدن بـه مقـدار ۵-۲ گرم در طیف سالانه می‌شود [۱۰].

1- Myelodysplastic syndrome

تزریق منظم خون باعث دو برابر شدن این انباشتگی می‌شود. بار آهن سالانه از طریق تزریق خون را می‌توان از تعداد واحدهای سلول‌های قرمز خون تخمین زد. یک واحد (۴۲۰ ml از خون دهنده) شامل حدود ۲۰۰ mg آهن است.

در صورتی که درمان انباشتگی آهن توسط شلاته‌کننده‌ها انجام نگیرد، می‌تواند باعث صدمه به کبد، قلب و سیستم اندوکرین شود. آهن در بافت‌های پارانشیمی و سلول‌های رتیکلواندوتلیال ذخیره می‌گردد. وقتی میزان آهن افزایش پیدا می‌کند، ظرفیت پیوندی آهن ترانسفرین سرم افزایش می‌یابد و قسمت غیرپیوندی ترانسفرین آهن پلاسما (NTBI)[1] ظاهر می‌شود، که باعث تولید رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل می‌گردد که این هم باعث صدمه جدی و خطرناک به بافت‌ها می‌شود. آهن با سرعت‌های مختلف در بافت‌های گوناگون انباشته می‌شود. براساس این مشاهدات، شلاتورهایی که آهن را از اندام‌های هدف جدا می‌کنند، می‌توانند مفید باشند. شلاتورها می‌توانند در روی منابع مختلف آهن عمل کنند: (i) آهن سرم متصل به ترانسفرین (ii) آهن در شکل غیرمتصل به ترانسفرین (NTBI)؛ (iii) وقتی ترانسفرین اشباع شده باشد، آهن ذخیره شده در فریتین و هموسیدرین؛ (iv) منبع ناپایدار آهن (LIP)[2] که در سیتوپلاسم وجود دارد.

در دو مورد اول شلاتورها به طور مستقیم روی پلاسما عمل می‌کنند در حالی که در دو مورد بعدی شلاتور مجبور به نفوذ به سلول‌هاست به طوری که کمپلکس آهن- شلات باید سلول را ترک کند. شلاتورهای آهن بایستی تراز آهن بافت‌ها را کاهش بدهند و از انباشتگی آهن اضافی در اندام‌ها جلوگیری کرده و سمیت منابع آهن ناپایدار را از بین ببرند. جذب از طریق دستگاه گوارش و نفوذ سلولی، هر دو بستگی به پخش از طریق غشاهای بیولوژیکی دارند که تابع اندازه مولکولی، چربی دوستی و بار مولکولی خالص هستند. در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی بر روی لیگندهای دو و سه دندانه‌ای انجام گرفته که به نظر می‌آید از طریق خوراکی موثرتر باشند.

تاثیر شلاتورهای آهنی که امروزه استفاده می‌شوند به وسیلهٔ این واقعیت که آنها به متابولیت‌های گلوکرونیدیت[3] تبدیل می‌شوند محدود می‌گردد: اغلب دفروکسامین[4] ها و دفروپرون[5]ها به شکل گلوکرونید غیر فعال متابولیزه می‌شوند و خاصیت شلاته کنندگی آنها کمتر از ۱۰٪ می‌شود.

1- NTBI:Non- transferrin- bound iron
2- LIP:Labile iron pool
3- Glucuronidite
4- Deferoxamine
5- Deferiprone

مسئله بعدی که باید در طراحی این ترکیبات در نظر داشت کاهش سرعت متابولیزه شدن است. خصوصیات اصلی که یک شلاتور آهن باید داشته باشد عبارتند از:

- خاصیت شلاته‌کنندگی زیاد
- تمایل ویژه برای Fe (III)
- داشتن پتانسیل ردوکس مناسب کمپلکس‌ها
- ساختمان شیمیائی کمپلکس‌ها
- کینتیک سریع تشکیل کمپلکس
- سرعت کم متابولیسم
- توانایی مصرف به شکل خوراکی
- قابلیت نفوذ به داخل بافت و سلول
- نداشتن خاصیت از دست دادن آهن
- سمیت کم
- رسیدن به یک تعادل آهن منفی
- قیمت پائین

در واقع آهن برای بسیاری اعمال متابولیک (انتقال و استفاده از اکسیژن، سنتز DNA، انتقال الکترون) اساسی است، ولی وقتی انباشته شود مسمومیت ایجاد می‌کند. بنابراین یک شلاتور بایستی فقط آهن اضافی را بر دارد بدون اینکه به تعادل آهن (جذب، پخش و مصرف) و به آنزیم‌های وابسته به آهن (ریبونوکلئوتیدرداکتاز، لیپواکسیژناز) لطمه بزند و باعث خارج شدن فلزات اساسی دیگر مثل روی و مس و کلسیم شود.

خصوصیاتی مانند وزن مولکولی، تعادل لیپو- هیدروفیلیک، کینتیک، پخش و متابولیسم در تعیین مرز بین سلامت و سمیت مهم و اساسی هستند. در طراحی شیمیائی شلاتورهای آهن برای کاربردهای کلینیکی، انتخاب فلز و پایداری کمپلکس لیگاند- فلز عامل بسیار مهمی است.

در تئوری، عوامل شلاته‌کننده می‌توانند هم برای Fe (II) و هم برای Fe (III) طراحی شوند. Fe (III) با اسپین بالا یک کاتیون سه ظرفیتی متقارن است با شعاع ۰/۶۵ Å که به عنوان یک اسید لوئیس سخت طبقه‌بندی می‌شود که دانستیه بار بالایی دارد و پایدارترین پیوندها را با لیگاندهای سخت مثلاً اتم‌های اکسیژن هیدروکسامات باردار ایجاد می‌کند. بر عکس، کاتیون Fe(II) که دانستیه بار نسبتاً کمی دارد، شلاتورهایی را ترجیح می‌دهد که شامل اتم‌های دهنده نرم مانند لیگاندهای حاوی نیتروژن هستند. از آنجا که لیگاندهایی که Fe(II) را ترجیح می‌دهند نسبت به سایر فلزات دو

ظرفیتی مهم از نظر بیولوژیکی مانند Cu (II) و Zn (II) تمایل دارند، طراحی یک لیگاند غیرسمی برای Fe(II) خیلی مشکل است. در مقابل، لیگاندهایی که Fe(III) را انتخاب می‌کنند، مثل اکسی‌آنیون‌ها و هیدروکسومیت‌ها و کاتکولات‌ها[1] بیشتر برای کاتیون‌های سه ظرفیتی انتخابی هستند تا کاتیون‌های دو ظرفیتی. بسیاری از کاتیون‌های سه ظرفیتی مانند Al (III) و Ga (III) برای سلول‌های زنده اساسی نیستند، بنابراین در عمل، Fe(III) برای یک شلاتور آهن در شرایط بیولوژیکی بهترین هدف است [۱۱]. تزریق مکرر خون که باعث انباشتگی آهن می‌شود باعث بروز مشکلاتی می‌گردد که زندگی را تهدید می‌کند و اگر شلات درمانی به طور منظم انجام نگیرد، باعث مرگ زودرس می‌گردد [۱۳و۱۲]. شلات درمانی[2] آهن (ICT) با دفروکسامین (DFO) که روشی استاندارد و متداول برای انباشتگی آهن است، یک روش معالجه بلندمدت است که می‌تواند از آسیب رساندن به اندام‌ها توسط آهن مازاد و مشکلات بعدی آن جلوگیری کند و در بیمارانی که نیاز به تزریق مرتب خون دارند مثل مبتلایان به β- تالاسمی نیز می‌تواند موثر باشد[۱۵و۱۴].

شلات درمانی با DFO نیاز به تزریق زیر جلدی یا وریدی دارد که باید هر ۸ تا ۱۲ ساعت و به مدت ۵ بار در هفته انجام بگیرد [۱۶]. گرچه DFO به عنوان یک عامل شلاته‌کننده موثر شناخته شده است ولی بعضی بیماران ممکن است ناراحتی‌هایی مانند سمیت‌هماتولوژیک، اشکال در تنفس، اختلال در رشد، کاهش شنوایی، سر درد، سرگیجه و جوش‌های پوستی را تجربه کنند [۱۷].

علاوه بر این‌ها، معالجه بلندمدت که شامل تزریق مرتب خون و ICT روزانه است بر روی بیماران و کیفیت زندگیشان اثرات منفی می‌گذارد [۲۰و۱۹و۱۸].

به طور کلی خصوصیات ایده‌آل برای یک عامل شلاته‌کننده مؤثر عبارتند از: خوراکی بودن، توانایی بیرون کشیدن آهن از کبد، میوکاردیوم و سایر بافت‌ها، عدم ایجاد مسمومیت در کلیه‌ها و مغز استخوان و لطمه‌نزدن به سیستم اعصاب مرکزی و جنین [۲۱]. قبل از معرفی دفراسیروکس[3] دفروکسامین تنها عامل شلاته‌کننده‌ی قابل دسترس در ایالت متحده بود. دفروکسامین از سال ۱۹۷۰ به عنوان یک داروی معالج استاندارد به کار می‌رود [۲۲]. ولی استفاده از آن بدون اشکال نیست. دفروکسامین به صورت تزریق زیر جلدی در طی ۸ تا ۲۴ ساعت و به مدت پنج تا هفت روز در هفته به کار می‌رود و با یک سرنگ کوچک قابل حمل در طی شبانه روز می‌تواند به کار رود [۲۳].

به همین دلیل تقریباً یک سوم بیمارانی که با دفروکسامین تحت درمان هستند، معالجه را ادامه نمی‌دهند [۲۴].

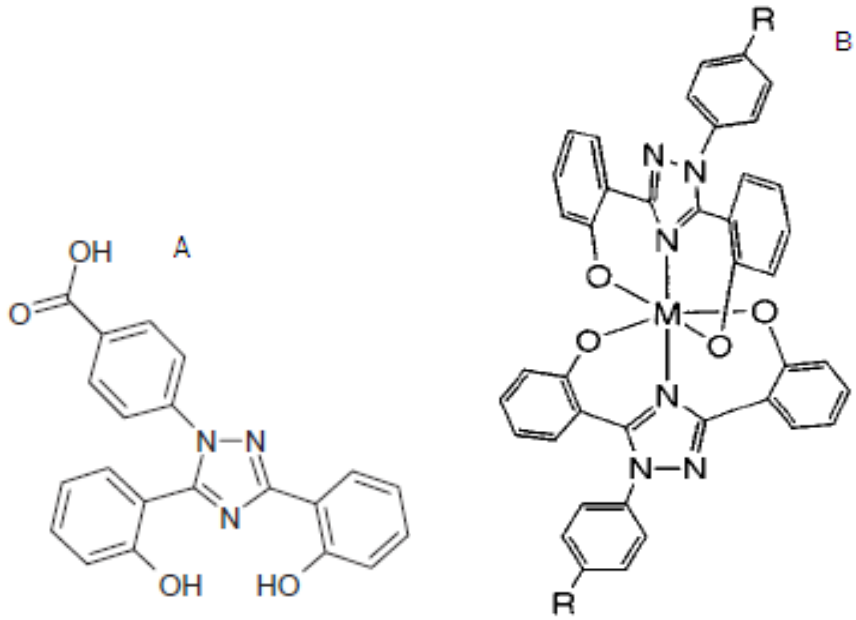
---

1 -Catecholates
2 -Chelation therapy
3 -Deferasirox

در نوامبر ۲۰۰۵، اداره کل غذا و داروی امریکا (FDA)[1]، دفراسیروکس را جهت معالجه بیماران بالای دو سالی که دچار انباشتگی آهن بدلیل تزریق خون بودند، معرفی کرد[۲۵]. این دارو اولین داروی خوراکی است که استفاده از آن توسط FDA به تصویب رسیده است. نیمه عمر آن بین ۸ و ۱۶ ساعت با دوز یکبار در روز است.

دو مولکول دفراسیروکس می‌توانند به یک اتم آهن متصل شده سپس توسط مدفوع از بدن دفع گردند . وزن مولکولی کم آن و لیپوفیلی بالای آن به دارو این اجازه را می‌دهد که به شکل خوراکی دریافت گردد. در مقایسه با دفروپرون، به نظر می‌آید که دفراسیروکس قادر به خارج کردن آهن از سلول‌های ماهیچه‌ای قلب و کبدی باشد.

نام علمی دفراسیروکس، ٤- [۳و۵- بیس (۲-هیدروکسی فنیل) ۱و۲و٤- تریازول ۱- ایل] بنزوئیک اسید[2] می‌باشد که با نام تجاری Exjade به فروش می‌رسد و نام دیگر آن ICL 670 است. فرمول مولکولی آن $C_{21}H_{15}N_3O_4$ و وزن مولکولی آن ۳۷۳/۳٦۲g/mol است. ۸٤٪ آن توسط مدفوع و ۸٪ آن توسط کلیه‌ها دفع می‌گردد.



شکل ۱-A۱) مولکول دفراسیروکس B) پیوند دو مولکول دفراسیروکس با اتم آهن

1 - Food and Drug Administration

2- 4-[3,5-bis (2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl] benzoic acid

۲-۱ بررسی خواص فلورسانس داروی دفراسیروکس و کمپلکس آن با یون‌های لانتانید

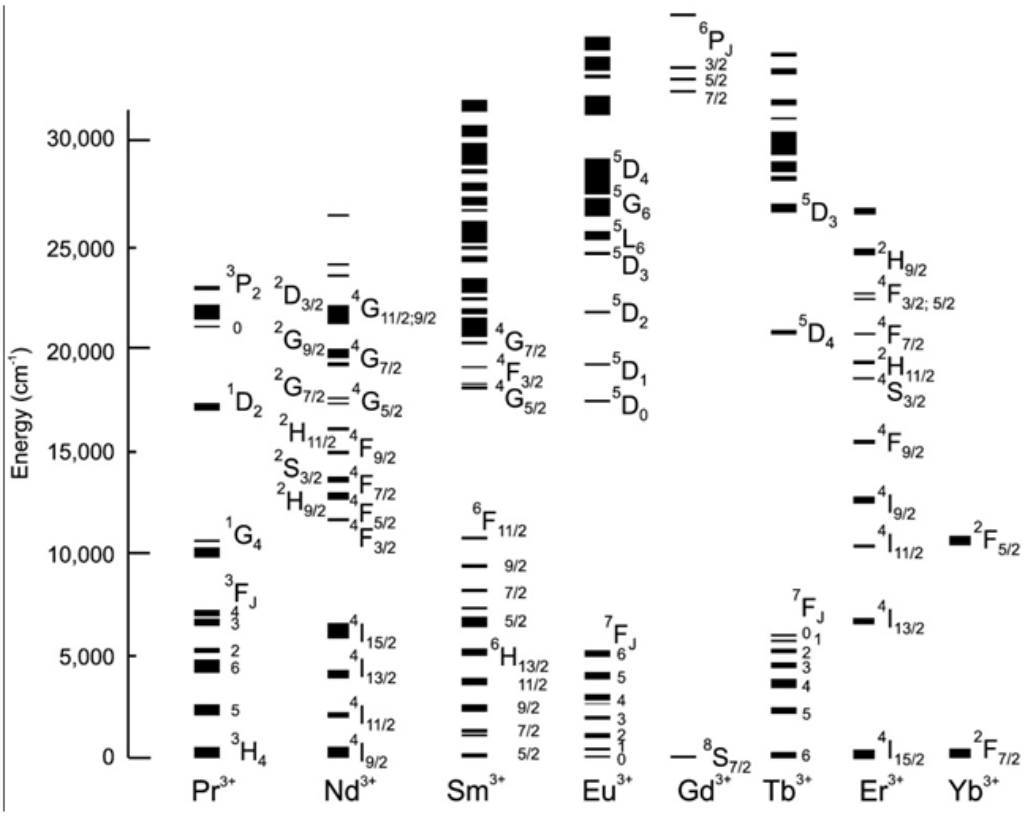
کمپلکس‌های کئوردیناسیون یون‌های لانتانید (Eu^{3+}, Tb^{3+})، بدلیل خصوصیت نشری ویژه و حساسیت بالا، به عنوان پروب‌های لومینسنت مولکول‌های بیولوژیکی و دارویی توجه قابل ملاحظه‌ای را جلب کرده‌اند. چنین پروب‌های لومینسنتی به فراوانی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم داروها و ترکیبات بیولوژیکی مهم از قبیل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، DNA، ATP و ... بر پایه افزایش حساسیت‌زایی یا خاموش‌سازی فلورسانس حساس شده پروب‌ها توسط آنها که نقش تقویت‌کننده یا خاموش‌کننده را دارند به کار رفته‌اند. تتراسایکلین‌ها[1]، فنانترولین[2] و فلوئوروکینولون‌ها[3] غالباً به عنوان عوامل شلاته‌کننده قوی و دارای سطح انرژی سه‌تایی مناسب استفاده شده‌اند [۲۷و۲۶]. افزایش لومینسانس حساس شده کمپلکس‌های لانتانید با استفاده از عوامل تقویت‌کننده فنانترولین، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به کار رفته است [۲۸]. مواد بیولوژیکی نظیر هپارین (Hep)، DNA، ATP و گلایسین (GLy) با استفاده از تربیوم اندازه‌گیری شده‌اند [۲۹]. بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی و موادی با فعالیت ضدباکتری نیز با این روش اندازه‌گیری شده‌اند.

یون‌های تربیوم می‌توانند در محلول‌های آبی با انواع زیادی از ترکیبات آلی مثل بازهای سخت (لیگاندهای دارای اتم اکسیژن) و بازهای نرم (لیگاندهای دارای اتم نیتروژن) بر هم کنش داده و کمپلکس‌های لومینسیت تشکیل دهد. اکثر مواد با خواص بیولوژیکی و داروئی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، کاتکول آمین‌ها، پروتئین‌ها و ... از خود فلورسانس نشان نمی‌دهند و یا اینکه خواص فلورسانس ذاتی آنها بسیار ضعیف می‌باشد. خواص طیفی (نوارهای نشری باریک و تیز با جابجائی‌های بزرگ استوکس و زمان‌های زوال طولانی)، گزینش‌پذیری بالایی را برای روش‌هایی که بر مبنای نشر حساس شده پایه‌گذاری شده‌اند، ایجاد کرده و امکان حذف مزاحمت‌های ماتریکس (فرآیندهای خاموش‌سازی زمینه نمونه، هم‌پوشانی طیفی و ...) را که اکثر روش‌های تجزیه‌ای با آن روبرو هستند، میسر کرده است.

لانتانیدها چهارده عنصر می‌باشند که به دنبال لانتانیوم در جدول تناوبی آورده می‌شوند. یون‌های لانتانید در آرایش لایه الکترونی 4f پر نشده که در آن چهارده الکترون به طور متوالی به آرایش الکترونی لانتانیوم اضافه می‌شود، تفاوت دارند. آرایش الکترونی 4f نقش مهمی را در انتقال تابشی

1- Tetracycline
2- Phenanthroline
3- Fluoroquinonlone

این عناصر، به ویژه زمانی که با لیگاندهای آلی مناسب شلاته شده باشند و انرژی تحریک لیگاند تحریک شده به یون فلزی گیرنده در طول عمر حالت تحریک شده انتقال داده میشود، ایفا می‌کند. الکترون‌های ۴f یون‌های لانتانید سه ظرفیتی توسط لایه بیرونی الکترون‌های ۵s و ۵p که در پیوند به میزان اندکی شرکت می‌کنند، به خوبی محافظت می‌شود. این بدین معنی است که در نتیجه اثر پوششی، الکترون‌های ظرفیتی از بر همکنش‌های خارجی مصون می‌شوند و انرژی آنها توسط محیط اطراف یون کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بنابراین خواص شیمیایی، اسپکتروسکوپی و مغناطیسی این یون‌ها حتی بعد از تشکیل کمپلکس حفظ می‌شود. نتیجه دیگر محافظت اربیتال‌های ۴f آن است که یون‌های لانتانید ماهیت اتمی خود را حفظ می‌کنند ولی از آنجا که ضرایب جذب مولی پائینی در نواحی ماوراء بنفش نزدیک- مرئی ($<10\ l\ mol^{-1}cm^{-1}$) دارند، نشر آن‌ها به صورت ضعیف مشاهده می‌شود. همچنین طیف‌های جذبی و نشری آنها به صورت خطوط تیز با شدت پائین ظاهر می‌شود و حالت‌های برانگیخته با عمر طولانی در حد میلی ثانیه ایجاد می‌شود. از آنجا که خطوط نشری باریک یون‌های لانتانید به سهولت قابل تشخیص هستند، این ویژگی جهت توسعهٔ پروب‌های باارزش لومینسنت به کار گرفته می‌شود [۳۲ و ۳۱و ۳۰].



شکل ۱-۲ شمایی از سطوح انرژی تعدادی از یونهای لانتانید