

بررسی اسپکتروسکوپی برهمکنش مشتق تترازول سنتز شده با روش نیمه سبز با DNA تیموس گوساله و پروتئین سرم گاوی

جواد سرگلزائی^۱، سهیلا خاقانی نژاد^۲

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۹/۱۲

چکیده

پیش زمینه و هدف: در چند دهه اخیر، کاربرد ساختارهای تترازولی در حوزه‌های گوناگون پزشکی و صنعت اهمیت فراوانی یافته‌اند زیرا می‌توانند باعث تغییرات ساختاری و در نتیجه عملکردی در پروتئین‌ها شوند. در این مقاله بررسی تأثیر مشتق جدیدی از تترازول را به DNA تیموس گوساله (Ct-DNA) و پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) در محلول با استفاده از روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار: ساختار اول و دوم و سوم پروتئین BSA و Ct-DNA به ترتیب با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis، دورنگ نمایی دورانی (CD)، طیف‌سنجی فلورسانس مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که میزان جذب نوری Ct-DNA و BSA در اثر میانکنش با اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر افزایش می‌یابد. طیف نشری Ct-DNA و BSA در یک روند وابسته به غلظت اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل کاهش یافته که نشان‌دهنده اتصال اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با کروموفورهای موجود در Ct-DNA و BSA است. اتصال اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل سبب افزایش قابل توجه ellipticity، دورنگ نمایی دورانی ملکول DNA در نواحی ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر و منفی‌تر شدن آن در ۲۴۵ نانومتر می‌شود که نشان‌دهنده اتصال محکم‌تر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به Ct-DNA است. با افزایش غلظت، بیضی‌واری مولی مربوط به مارپیچ آلفای موجود در ساختار BSA در ناحیه ۲۲۰ نانومتر منفی‌تر می‌شود که نشان‌دهنده افزایش مقدار پیچه نامنظم در ساختار BSA است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اتصال این مشتق تترازولی به BSA بیشتر از DNA می‌باشد که می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه طراحی داروهای با مشتقات تترازولی با اثر ضد توموری بیشتر و عوارض جانبی کمتر در اختیار ما قرار دهد.

کلیدواژه‌ها: پروتئین سرم گاوی، DNA تیموس گوساله، اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی دورانی، اسپکتروسکوپی فلورسانس، اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره ششم، ص ۴۰۳-۳۹۲، شهریور ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۹۱۵۵۴۲۱۸۰۸

Email: j-sargolzaei@araku.ac.ir

مقدمه

تعداد اتم نیتروژن در میان ترکیب‌های هتروسیکل، با عناوینی از قبیل: ترکیب‌های غنی از نیتروژن، غنی از الکترون و هتروآروماتیک نامبرده می‌شوند (۱). تترازول‌ها ترکیباتی حلقوی و آروماتیک، شامل چهار اتم نیتروژن و یک کربن می‌باشند. این ترکیبات در صنایع مختلف از جمله صنایع نظامی کاربرد فراوانی دارند. این ترکیبات پس از احتراق مقادیر زیادی گاز N₂ آزاد می‌کنند و به همین دلیل

تترازول‌ها، دسته‌ای از ترکیب‌های هتروسیکل آلی هستند که از یک حلقه پنج عضوی، شامل یک اتم کربن و چهار اتم نیتروژن تشکیل شده‌اند. این ترکیب‌ها در طبیعت یافت نمی‌شوند و به صورت سنتزی تهیه می‌گردند. تترازول‌ها با توجه به دارا بودن بیشترین

^۱ استادیار بیوشیمی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (نویسنده مسئول)

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

آلودگی کمی برای محیط زیست داشته و جزء مواد منفجره سبز به حساب می آید. از طریق وارد کردن تترازول ها در ساختار زنجیرهای پلیمری می توان خواص انرژی زایی پلیمرها را افزایش داد. تاکنون روش های مختلفی جهت سنتز پلی تترازول ها گزارش شده است که در اکثر آن ها تترازول ها به صورت شاخه های آویزان و متصل به زنجیر اصلی قرار گرفته اند. در صورت استفاده از حلقه های تترازول عامل دار شده به عنوان منومر می توان حلقه ها را وارد ساختار زنجیر اصلی پلیمر کرد. با کنترل و بهبود خواص مکانیکی پلی تترازول ها، این پلیمرها به علت ایمپالس ویژه و پایداری حرارتی مناسب قابلیت جایگزینی با برخی از پلیمرهای پرانرژی مانند GAP را خواهند داشت. از جمله ترکیب های دارویی حاوی حلقه تترازول می توان به داروی ضد سرطان، ضد باکتری، ضد میکربی، ضد ویروس، داروی ضد دیابت، ضد شیذوفرنی، داروی ضد فشارخون و مهارکننده سیکلواکسیژناز-۲، اشاره نمود (۴-۲). اکسیندول ها زیر مجموعه ای از هتروسیکل ها هستند که دارای جایگاه ویژه ای در حوزه شیمی آلی طبیعی و سنتزی بوده و حضور این هسته ها در ساختارهای شیمیایی موجب بهبود ویژگی های بیولوژیکی و دارویی می شود (۵) که تعدادی از آن ها به عنوان حد واسطه بالقوه در سنتز آلکالوئیدها و حد واسطه های دارویی و داروشناسی بالینی کاربرد دارند و تعدادی دیگر از اکسیندول ها در ترکیب های درونی بافت های مایع بدن پستانداران به خصوص در مرکز سیستم عصبی توزیع شده اند (۶) و دامنه گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی را از خود نشان می دهند. از جمله ویژگی های مهم این ترکیب فعالیت های ضد باکتری، ضد قارچ، ضد تشنج، ضد ویروس و ضد تکثیر می باشد. می توان با استفاده از مایع های یونی آزید دار به عنوان منبع نسبتاً سبز و مواد اولیه قابل دسترسی، از طریق واکنش کلیک، هسته های با ارزش اکسیندول حاوی حلقه های تترازولی را سنتز کرد. یکی از مشتقات جدید تترازول 2-(Z)-2-(۲-اکسیندولین-۳-یلیدین)-۲-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل یا به عبارتی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل می باشد که به روش سبز تهیه شده است (۷، ۸). با وجود تلاش دانشمندان و پیشرفت علم و فناوری، سرطان هنوز از مهلک ترین بیماری های بشر است و بنابراین تحقیق بر روی این بیماری و راه های درمان آن بسیار مورد توجه می باشد. لذا شناسایی مکانیسم اثر داروهای ضد میکروبی برای به کار بردن مؤثرتر آن ها در درمان انواع سرطان می تواند مهم باشد. هسته مهم ترین ارگانیلی است که در سلول های یوکاریوتی وجود دارد و هدف بسیاری از ترکیبات جدید و همچنین داروهای ضد سرطان، هسته سلول می باشد. DNA در داخل هسته سلول های یوکاریوتی در هنگام همانندسازی یا رونویسی برهنه استولی به طور معمول، همراه با پروتئین های هیستونی و غیر هیستونی است که با هم ساختارهایی

به نام نوکلئوزوم را می سازند که کروماتین نامیده می شوند. از این رو داروهای ضد توموری برای انجام عمل خود می توانند DNA را چه به صورت تک رشته ای یا دو رشته ای مورد هدف قرار دهند (۹، ۱۰). آلبومین سرم (SA) فراوان ترین پروتئین در پلاسما خون است که عملکرد چندگانه دارد و به عنوان ناقل برای جابجایی بسیاری از لیگاند های درون زا و برون زا از جمله اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، یون های فلزات و مواد دارویی متعدد از طریق پیوند هیدروژنی، هیدروفوبیک، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات فلزی عمل می کند (۱۱). توانایی اتصال دارو به آلبومین سرم خون ممکن است بر توزیع، غلظت آزاد و متابولیسم دارو تأثیر بسزایی داشته باشد. بررسی اثر متقابل دارو و پروتئین در فارماکولوژی اهمیت قابل توجهی دارد. علاوه بر این، پارامترهای اتصال برای مطالعه فارماکوکینتیک و طراحی اشکال دارویی مفید هستند (۱۲). آلبومین سرم گاوی به دلیل شباهت ساختاری، هزینه تهیه کم و در دسترس بودن، معمولاً جایگزین آلبومین سرم انسانی می شود. شباهت بین BSA و آلبومین سرم انسانی از نظر هویت ۷۶ درصد و از نظر توالی اسیدهای آمینه ۸۸ درصد است (۱۳).

هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل بر DNA استخراج شده از تیموس گوساله و پروتئین سرم گاوی با روش های اسپکتروسکوپی می باشد. استفاده از غده تیموس گوساله به علت دارا بودن میزان بالای DNA نسبت به پروتئین این امکان را برای ما فراهم کرد تا اثر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل را بر روی DNA خالص و BSA بررسی کنیم.

مواد و روش کار

اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به عنوان مشتق تترازول به صورت سنتز شده از آزمایشگاه خانم دکتر خاقانی نژاد دانشگاه اراک تهیه شد. ۲ میلی گرم از مشتق تترازول با ۱ میلی لیتر محلول بافر تریس خریداری شده از شرکت مرک آلمان ترکیب نموده و محلول در یخچال نگهداری شد. Ct-DNA و BSA از شرکت SIGMA خریداری شد. جهت آماده سازی محلول DNA و BSA به مقدار ۲ میلی گرم از پودر آن با ۱ میلی لیتر بافر تریس ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۴ ترکیب و محلول در یخچال نگهداری شد.

اسپکتروسکوپی UV/Vis:

میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با Ct-DNA و BSA با استفاده از بافر تریس اسیدی ۱۰ میلی مولار (pH ۷/۲)، در دمای اتاق و به دوراز نور انجام گرفت. بدین منظور غلظت ثابتی از Ct-DNA و BSA تهیه و با غلظت های مختلف

اسپکتروسکوپی CD:

به منظور مطالعه تغییر ساختار دوم، پس از میانکنش DNA و BSA با اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل، از اسپکتروسکوپی CD استفاده گردید. مطالعه CD برای BSA و DNA در ناحیهی Far-UV و Near-UV در محدوده ۱۹۰-۳۲۰ مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر AVIV مدل ۲۱۵ با کووت کوارتز با عرض یک سانتیمتر برای ناحیه نزدیک و کووت با عرض ۱ میلی متر برای ناحیه دور و تحت جریان مداوم گاز ازت و در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد انجام شد. طیف نمونه های میانکنش از طیف نمونه های استاندارد داروی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل که در همین شرایط رسم شده بودند، کسر و داده ها تحت عنوان (Molar Ellipticity) و به صورت $[\theta]: \text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ گزارش شدند (۱۴).

یافته ها

مطالعه اثرات اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل بر BSA و Ct-DNA به صورت آزاد در محلول:
ترکیب اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل یکی از مشتقات تترازولی می باشد که برای اولین بار اثر این مشتق تترازول بر روی Ct-DNA و BSA انجام می شود. جزئیات نحوه اتصال اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به مولکول DNA و تغییراتی که در ساختار DNA ایجاد می کند در دست نیست. از طرفی هیچ اطلاعاتی درباره اینکه آیا این دارو اساساً با DNA و پروتئین و ترکیبات موجود در آن بندوبست پیدا می کند تاکنون دیده نشده است. به همین دلیل مطالعه حاضر اثر داروی نامبرده بر روی Ct-DNA و BSA در محلول را مورد بررسی قرار داده است.

مطالعه میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با Ct-DNA با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی:

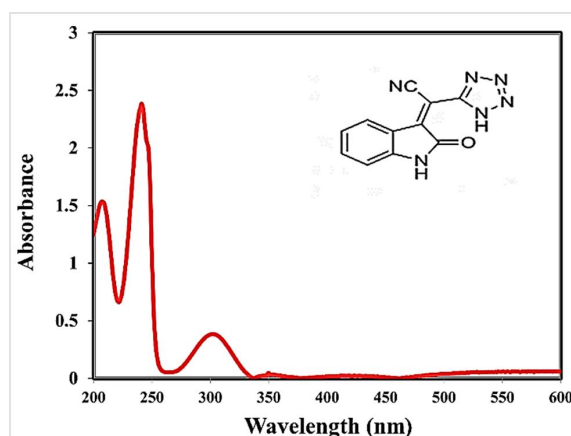
اسپکتروسکوپی جذبی یکی از روش های مناسب برای مطالعه ساختار ماکرو مولکول ها است (۱۴). به منظور بررسی خصوصیات اسپکتروسکوپی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل، ابتدا طیف جذبی این ترکیب بین طول موج های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر رسم گردید (شکل ۱). همان طور که مشاهده می شود طیف جذبی این دارو دارای یک قله جذبی در ۲۱۰ نانومتر و چند قله جذبی در ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۳۰ نانومتر می باشد. لذا با توجه به طیف جذبی، طول موج ۲۴۰ نانومتر به عنوان جذب شاخص اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل انتخاب گردید.

اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل انکوبه و پس از اتمام زمان مورد نظر، به منظور مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis مورد استفاده قرار گرفت.

میزان جذب محلول حاصل از میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با Ct-DNA و BSA و نیز میزان جذب غلظت های مختلف دارو در بافر تریس اسیدی در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Carry 100 مدل Bio-Varian ساخت کشور استرالیا خوانده شد و پس از انجام محاسبات لازم منحنی های مربوطه رسم گردید.

اسپکتروسکوپی فلورسانس:

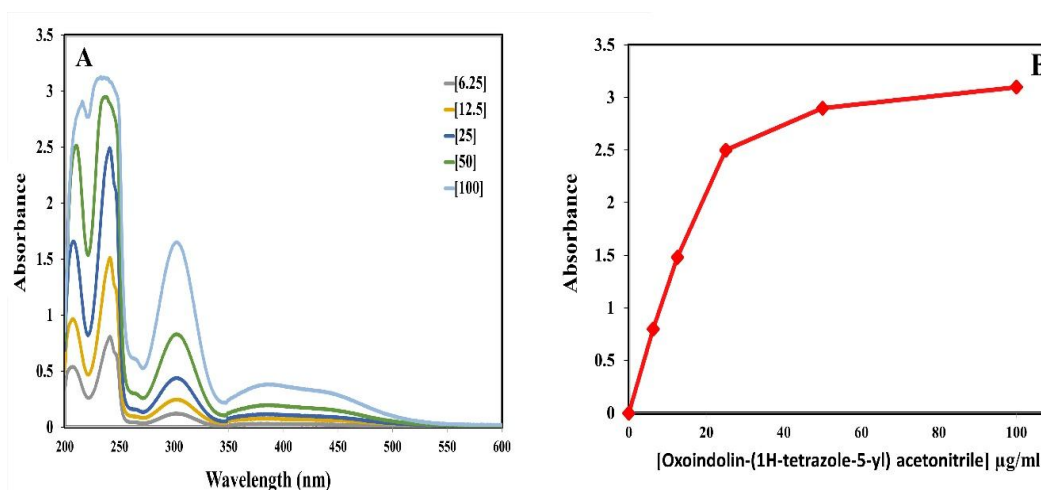
به منظور انجام مطالعات اسپکتروسکوپی فلورسانس، ابتدا غلظت ثابتی BSA و Ct-DNA با غلظت های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل در دمای اتاق و به دوراز نور به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از سپری شدن مدت زمان معین، محلول حاصل از میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با DNA در طول موج ۲۵۸ نانومتر و با BSA در طول موج ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف نشر آن ها در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر Carry Eclipse مدل Bio-Varian ساخت کشور استرالیا رسم گردید. همچنین طیف نشر نمونه های استاندارد اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با DNA در محدوده ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر و برای BSA در طول موج ۵۰۰-۲۲۰ و برای رسم و سپس از میزان نشر نمونه های تیمار شده کسر گردید. در طول انجام آزمایش ها Slit های تهییجی و نشری به ترتیب ۱۰ و ۵ نانومتر در نظر گرفته شد و از کووت کوارتز با عرض یک سانتیمتر استفاده گردید. پس از رسم منحنی های حاصل از میانکنش، با توجه به اطلاعات به دست آمده منحنی $I_0/I \times 100$ در برابر غلظت های مختلف دارو رسم گردید. I_0 در این فرمول شدت نشر فلورسانس در غیاب دارو و I شدت نشر فلورسانس در حضور غلظت های مختلف دارو می باشد. همچنین ثابت معادله اشترن - ولمر (Ksv) برای تخمین میزان خاموشی فلورسانس محاسبه گردید (۱۰). در معادله اشترن - ولمر $I_0/I = 1 + Ksv [Q]$ ، I_0 و I به ترتیب مقدار نشر ذاتی در غیاب و حضور خاموش کننده (اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل)، [Q] غلظت خاموش کننده، Ksv ثابت خاموشی اشترن - ولمر فلوئورهای در معرض خاموش کننده می باشد (۱۱، ۱۴). بر این اساس Ksv برای اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به عنوان شیب نمودار I_0/I بر غلظت های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به دست آمد.



شکل (۱): طیف جذبی داروی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-یل) استونیتریل در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر.

است (۱۵). در مورد اثر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-یل) استونیتریل بر روی DNA و BSA اطلاعاتی در دست نیست و داده‌های موجود در خصوص ترکیب نامبرده بر روی ساختار DNA نیز وجود ندارد. به همین دلیل تصمیم بر آن شد که اثر این دارو بر Ct-DNA و BSA محلول بررسی و نتایج حاصل از میانکشی آن با Ct-DNA و BSA مورد بررسی قرار گردد. بدین منظور غلظت ثابتی از Ct-DNA و BSA با غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-یل) استونیتریل در دمای اتاق و به‌دوراز نور انکوبه و پس از گذشت مدت‌زمان موردنظر، مطالعات مختلف اسپکتروسکوپی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

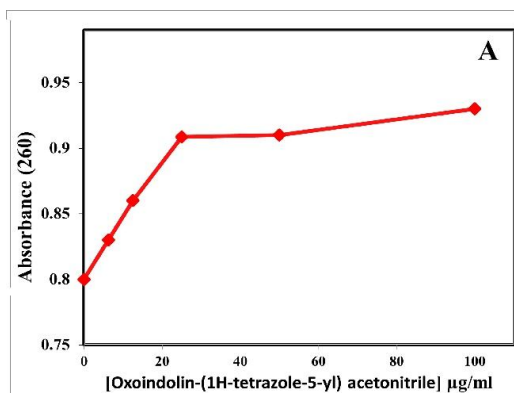
DNA در هسته سلول‌های یوکاریوت در هنگام همانندسازی برهنه است و ممکن است مورد هدف بسیاری از ترکیبات یا آنزیم‌های مختلف قرار گیرد ولی در حالت معمول برهنه نیست و در اتصال با پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی است که مجموعاً ترکیب نوکلئوپروتئینی به نام کروماتین را ایجاد می‌کند از طرفی در ساختار کروماتین، DNA حول اکتامر هیستونی پیچیده و نوکلئوزوم را تشکیل می‌دهد. همچنین این ترکیب می‌تواند توسط پروتئین سرمی حمل شود ولی تاکنون مطالعات زیادی در زمینه نحوه اثر داروهای ضد تومور بر روی ساختار کروماتین و DNA صورت گرفته



شکل ۲- (A) طیف جذبی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-یل) استونیتریل در غلظت‌های مختلف میکروگرم بر میلی لیتر در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار. (B) تغییرات میزان جذب این ترکیب در طول موج ۲۴۰ نانومتر (به‌عنوان جذب شاخص) در برابر غلظت‌های مختلف ترکیب

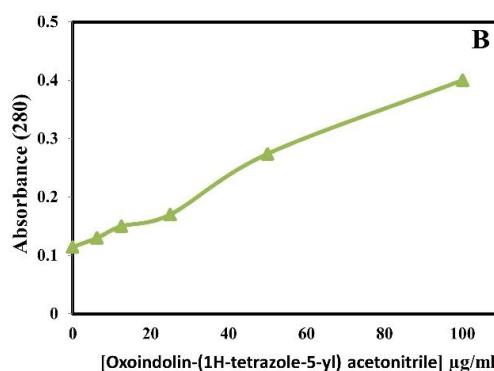
داروی اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل با Ct-DNA و BSA رشته در طول موج های ۲۶۰ نانومتر (A) و ۲۸۰ نانومتر (B) را نشان می دهد و همان طور که مشاهده می شود تغییرات جذب DNA تک رشته یک روند مشابه را طی می کنند. شکل A-۳ به صورت مقایسه ای روند تغییرات میزان جذب DNA تک رشته پس از انکوباسیون با اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل در طول موج ۲۶۰ نانومتر را نشان می دهد. در غلظت های مختلف میزان جذب DNA تک رشته افزایش می یابد و در غلظت های بالاتر نیز همچنین جذب افزایش می یابد. در حالیکه کاهش جذب در اثر میانکنش دارو با DNA در هیچ طول موج مشاهده نشد.

همان طور که در شکل B-۳ مشاهده می شود در اثر میانکنش داروی اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل با BSA در طول موج ۲۸۰ نانومتر در حضور همه غلظت های دارو جذب روند افزایشی را نشان می دهد. مشاهده دقیق تر نشان می دهد در غلظت پایین و بالای اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل میزان جذب افزایش می یابد.



به منظور بررسی تغییرات جذب نمونه های انکوبه شده با اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل از روش طیف سنجی جذبی UV/vis استفاده شد. طیف سنجی جذبی روشی مفید برای مطالعه ساختار ماکرو مولکول های مختلف است و از طرفی دیگر این روش یکی از ساده ترین و رایج ترین روش ها برای مطالعه میانکنش لیگاند - ماکرومولکول است.

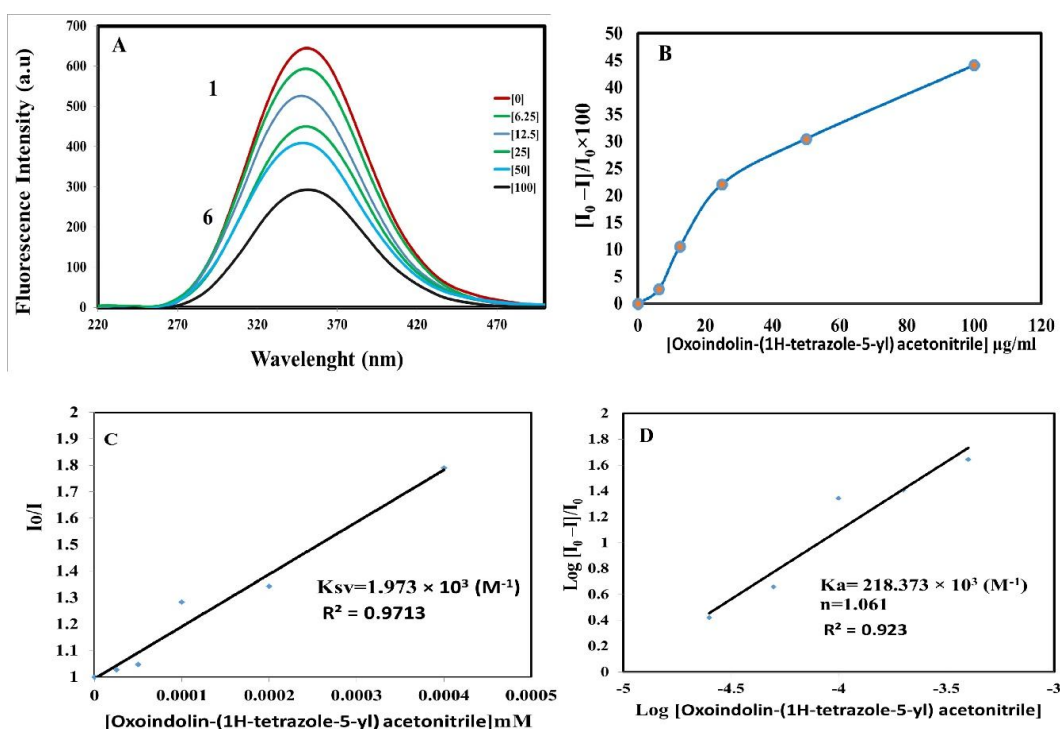
ابتدا طیف جذبی اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل در غلظت های مختلف و همچنین تغییرات میزان جذب این ترکیب در طول موج ۲۴۰ نانومتر (به عنوان جذب شاخص) در برابر غلظت های مختلف ترکیب در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار اندازه گیری شد (شکل شماره ۲). سپس میزان جذب نمونه های استاندارد اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل در هر غلظت از مقدار جذب نمونه های تیمار شده با غلظت مشابه اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل کسر و نمودار تغییرات جذب Ct-DNA و BSA برحسب غلظت دارو رسم گردید. شکل ۳ تغییرات میزان جذب محلول های حاصل از میانکنش



شکل (۳): مقایسه تغییرات میزان جذب DNA تک رشته پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل در طول موج های ۲۶۰ نانومتر (A) و ۲۸۰ نانومتر (B).

استونیتریل در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه و پس از اتمام زمان، نمونه های کنترل و تیمار شده به ترتیب در طول موج ۲۵۸ نانومتر و ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف جذبی آن ها رسم گردید. سپس میزان جذب فلورسانس نمونه های استاندارد دارو در هر غلظت از میزان جذب نمونه های تیمار شده با دارو در همان غلظت کسر و نمودار مربوط به Ct DNA و BSA در محدوده ۵۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر رسم گردید (شکل ۴ و ۵).

در ادامه به منظور بررسی میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل) استونیتریل با Ct-DNA و BSA از روش طیف نشری فلوروسانس استفاده شد. این روش نسبت به طیف سنجی جذبی کارآمدتر، حساس تر و از پیچیدگی بیشتری برخوردار است. با استفاده از روش اسپکتروسکوپی فلوروسانس می توان اطلاعات مهمی درباره ساختار ماکرومولکول به دست آورد (۱۴، ۱۶). بدین منظور غلظت معینی از Ct-DNA و BSA به طور جداگانه با غلظت های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-5-ایل)



شکل (۴): نمودار تغییرات طیف جذبی BSA (A) تیمار شده با غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل و پس از برانگیخته شدن در طول موج ۲۷۸ نانومتر. شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل می‌باشند. (B) تغییرات $I_0 - I / I_0 \times 100$ BSA تک رشته برحسب غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل (C) نمودار اشتراک-ولمر BSA، (D) ثابت اتصال K_a و تعداد محل اتصال n در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

ساعت، نمونه‌های انکوبه شده و کنترل در طول موج ۲۵۸ نانومتر تهییج و طیف نشری آن‌ها در محدوده ۵۰۰-۵۵۰ نانومتر رسم گردید. DNA دارای یک قله نشری در طول موج ۲۳۳ نانومتر است که به نوکائوتیدها مربوط می‌شود. همان‌طور که شکل ۵-A نشان می‌دهد در حضور اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل نشر فلورسانس DNA دچار هیپوکرومیسمی محسوسی می‌گردد. سپس با توجه به نتایج فلورسانس حاصل منحنی $I_0 - I / I_0 \times 100$ برحسب غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل رسم گردید (شکل ۵-B) که در آن شدت فلورسانس نمونه کروماتین در غیاب دارو و I شدت فلورسانس نمونه Ct-DNA و BSA در حضور دارو است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل، تمایل اتصال دارو به BSA به‌تدریج افزایش می‌یابد تا جایی که

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در طول موج تهییج ۲۷۸ نانومتر و در غیاب اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل، BSA دارای یک قله نشری در ۳۵۰ نانومتر هستند که مربوط به کروموفورهای موجود در BSA (اسیدهای آمینه حلقوی) است. با افزایش غلظت دارو میزان فلورسانس BSA کاهش می‌یابد (بدون اینکه در طیف BSA جابجایی صورت گیرد) به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان فلورسانس به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. کاهش میزان نشر با افزایش تدریجی غلظت دارو نشان‌دهنده خاموشی^۱ شدید کروموفورهای موجود در BSA است.

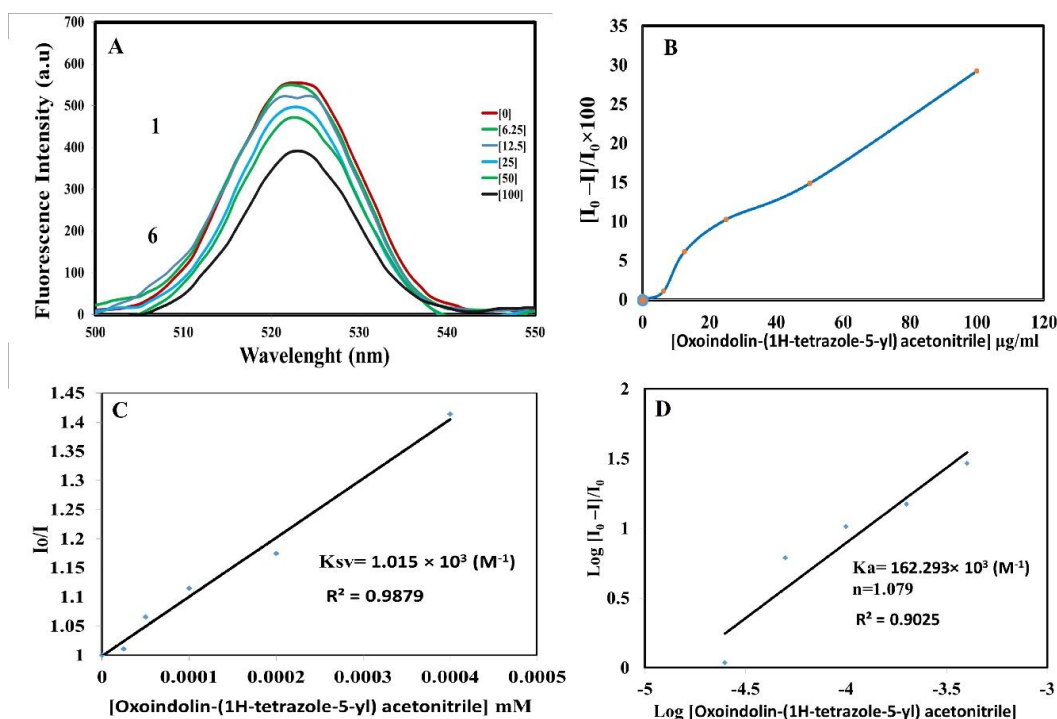
در رابطه با اتصال این ترکیب به DNA نیز غلظت‌های معینی از DNA به‌طور جداگانه با غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل در دمای اتاق انکوبه و پس از طی یک

^۱ Quenching

تقریباً به ماکزیمم خود رسیده و منحنی به حالت اشباع می‌رسد. ولی در مورد Ct-DNA این تمایل اتصال در مقایسه با BSA کمتر می‌باشد (شکل B-۴ و شکل B-۵).

شکل C-۴ و C-۵ نمودار اشتراک-ولمر را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده اثر خاموش‌کنندگی (Quenching) داروی اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل است. شیب این نمودار همان ثابت اشتراک-ولمر (میزان ثابت خاموشی) است و که به‌صورت مولار بیان می‌شود و مقادیر آن برای BSA برابر

$1.973 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ و برای Ct-DNA برابر $1.015 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ می‌باشد که نشان‌دهنده این است که دارو تمایل زیادی به BSA دارد. شکل 4-D ثابت اتصال اکسیندولین (H1-تترازول ۵ ایل) استونیتریل به BSA برابر $K_a = 218.373 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ و تعداد جایگاه اتصال $n = 1.061$ و شکل 5-D ثابت اتصال برای Ct-DNA به ترتیب $K_a = 162.293 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ و تعداد جایگاه اتصال $n = 1.079$ را نشان می‌دهد (جدول شماره ۱).



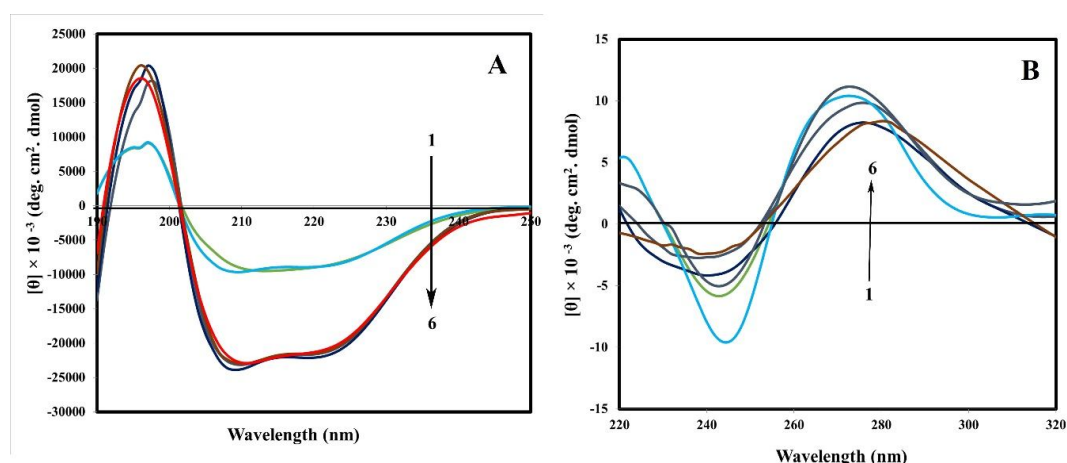
شکل (۵): نمودار تغییرات طیف جذبی DNA (A) تیمار شده با غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل و پس از برانگیخته شدن در طول موج ۲۵۸ نانومتر. شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل می‌باشند. (B) تغییرات $I_0 - I / I_0 \times 100$ بر حسب غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل (C) نمودار اشتراک-ولمر (D) ثابت اتصال K_a و تعداد محل اتصال n در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

اتاق و به‌دوراز نور انکوبه شدند. پس از گذشت زمان معین، طیف CD نمونه‌ها در غیاب BSA و Ct-DNA رسم گردید. سپس طیف CD غلظت‌های مختلف دارو در هر غلظت از طیف نمونه‌های تیمار شده با اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل در همان غلظت کسر شد و منحنی مربوطه رسم گردید (شکل ۶). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، طیف Ct-DNA در غیاب اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل دارای دو ناحیه مثبت یکی در ۲۲۰ نانومتر و دیگری در ۲۷۵ نانومتر و یک ناحیه

طیف‌سنجی CD روشی قوی در مطالعه خصوصیات کنفورماسیونی مولکول DNA تک رشته است و در مطالعه میانکنش اسیدهای نوکلئیک با پروتئین‌ها و لیگاندها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). به‌منظور مطالعه تأثیر اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل بر ساختار دوم مولکول Ct-DNA و BSA از روش دور نگ نمایی حلقوی (CD) در محدوده فرابنفش نزدیک و دور استفاده گردید. بدین منظور BSA و Ct-DNA با غلظت‌های مختلف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل در دمای

یافته و به سمت طول موج‌های بلندتر جابجا می‌شود. در ۲۴۵ نانومتر با افزودن بر میزان اکسیندولین (HI-تترازول ۵ ایل) استونیتریل ellipticity مثبت‌تر شده و نمودار بدون تغییر در طول موج می‌باشد و بالاخره در ۲۲۰ نانومتر علاوه بر افزایش ellipticity، مقداری جابجایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر وجود دارد.

منفی در ۲۴۵ نانومتر می‌باشد. و طیف BSA دارای یک باند منفی با دو کمینه در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که نشان‌دهنده بالا بودن مارپیچ آلفا در ساختار BSA می‌باشد. افزایش غلظت اکسیندولین- (HI-تترازول-۵ ایل) استونیتریل، ellipticity مولکول Ct-DNA در همه نواحی از جمله در ۲۴۵، ۲۴۰ و ۲۲۰ نانومتر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۷). در ۲۷۵ نانومتر و در حضور دارو ellipticity کاهش



شکل (۶): طیف CD مولکول BSA (A) DNA (B) در حضور غلظت‌های مختلف اکسیندولین- (HI-تترازول-۵ ایل) استونیتریل شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۰۰۲۵، ۰۰۵، ۰۱۲، ۰۲۵، ۰۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسیندولین- (HI-تترازول-۵ ایل) استونیتریل.

جدول (۱): مقادیر پارامترهای اتصال و پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش اکسیندولین- (HI-تترازول-۵ ایل) استونیتریل با Ct-DNA و

BSA					
Drug	Macromolecule	Temperature (°C)	$K_{sv} \times 10^3 (M^{-1})$	n	$K_a \times 10^3 (M^{-1})$
Oxindolin-(1H-tetrazole-5-yl) acetonitrile	BSA	۲۵	۱/۹۷۳	۱/۰۶۱	۲۱۸/۳۷۳
	Ct-DNA	۲۵	۱/۰۱۵	۱/۰۷۹	۱۶۲/۲۹۳

هتروسیکل نیز در شیمی هماهنگی مهم هستند (۲۰) و کاربردهای گسترده‌ای در علم داروسازی و مواد پیدا کرده‌اند. تعدادی از آن‌ها نیز به‌عنوان مواد منفجره گزارش شده است (۲۱) آن‌ها همچنین به‌عنوان عامل تولید گاز برای کیسه‌های هوا و سیستم‌های عکاسی و ضبط استفاده می‌شوند (۲۲) با توجه به این کاربردها، تترازول‌ها همیشه به‌عنوان اهداف مصنوعی مهم در نظر گرفته شده‌اند (۲۳). با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد و کاربردهای تترازول در

بحث و نتیجه‌گیری

تترازول‌ها از جمله سیستم‌های هتروسیکلیک مهم هستند. و از نظر بیولوژیکی با اسیدهای کربوکسیلیک مقایسه می‌شوند (۱۸) چندین مشتق تترازول قدرت‌های بیولوژیکی مختلفی را نشان می‌دهند، مانند فعالیت‌های ضد باکتری، ضد التهابی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد سل، مهارکننده‌های سیکلوآکسیژناز، ضد درد، کاهش قند خون و ضد سرطان (۱۹). چندین مشتق از این

حوزه‌های متفاوت و همچنین عدم سنتز آن‌ها در طبیعت، باعث شده که نظر محققین روی اثرات مشتق‌های این ترکیبات که از شیوه‌های ارزان‌تر و سازگار با محیط‌زیست سنتز می‌شود را بر روی DNA و پروتئین با روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار دهد.

اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل یکی از مشتقات سنتزی تترازول است، که احتمالاً دارای فعالیت بیولوژیکی فراوانی است و احتمالاً یکی از اهداف آن DNA می‌باشد. هسته سلول، DNA برهنه نیست بلکه به دور اکتامر هیستونی پیچ‌خورده و ساختاری به نام نوکئوزوم می‌سازد، از آنجایی که هسته سلول از مهم‌ترین اهداف داروهای ضد تومور می‌باشد و تاکنون مطالعاتی در خصوص میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با DNA صورت نگرفته و هیچ اطلاعاتی درباره اثر داروی نامبرده بر DNA تک رشته و ترکیبات آن وجود ندارد. لذا مطالعه حاضر نشان می‌دهد Ct-DNA و BSA می‌تواند به‌عنوان اهداف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل درون هسته سلول در نظر گرفته شوند.

نتایج به‌دست‌آمده از افزایش جذب Ct-DNA و BSA در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌صورت وابسته به غلظت بوده و نشان‌دهنده مشارکت گروه‌های فسفات و بازهای DNA و همین‌طور همکاری کروموفورهای BSA در میانکنش با دارو می‌باشد. در غلظت‌های بالا اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل ساختار Ct-DNA و BSA باز شده و در نتیجه میزان جذب افزایش می‌یابد. شدت افزایش جذب در مورد Ct-DNA و BSA نشان‌دهنده تمایل بیشتر دارو برای اتصال به این مولکول‌ها را نشان می‌دهد.

خاموشی کروموفورهای BSA و میانکنش آن‌ها در حضور دارو موجب کاهش شدت نشر فلورسانس BSA می‌شود. بررسی قدرت اتصال بو همچنین ضریب استرن ولمر به‌دست‌آمده برای دارو نشان می‌دهد که اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل اثر خاموش‌کنندگی قوی بر کروموفورهای BSA دارد. خاموشی فلورسانس در ۳۵۰ نانومتر پس از تهیه BSA در ۲۷۸ نانومتر، مربوط به آمینواسیدهای آروماتیک در ساختار BSA می‌باشد (۲۴، ۲۵). مطالعات ساختار کریستالی نشان داده که BSA متشکل از ۵۸۳ اسید آمینه دارای دو محل اتصال اصلی شامل سایت I و II است. سایت I و II به ترتیب در حفره‌های آبگریز زیر دومین IIA و زیر دومین IIIA قرار دارند. سایت I از نظر اندازه نسبتاً بزرگ‌تر است

که در آن خنثی‌ترین، حجیم‌ترین و ترکیبات هتروسیکلیک تمایل به اتصال از طریق فعل‌وانفعالات آبگریز دارند. در مقابل، سایت II از نظر اندازه کوچک‌تر است که شامل ترکیبی از برهمکنش‌های آبگریز، پیوند هیدروژنی و الکترواستاتیک است. به نظر می‌رسد سایت II محل اتصال دارو به BSA باشد. از مقایسه منحنی‌های $I_0 \times 100 / I$ می‌توان بیان نمود که تمایل اتصال اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به BSA بیشتر از اتصال آن به Ct-DNA است. با کمک معادله استرن-ولمر و از روی شیب این منحنی، ثابت استرن-ولمر Ct-DNA (K_{SV}) و BSA در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ به ترتیب $K_{SV} = 1.015 \times 10^3 M^{-1}$ و $K_{SV} = 973 \times 10^3 M^{-1}$ به دست آمد. محاسبه مقدار Ka برای Ct-DNA و BSA به ترتیب $162.293 \times 10^3 M^{-1}$ و $218.373 \times 10^3 M^{-1}$ و تعداد جایگاه‌های اتصال (n) Ct-DNA و BSA به ترتیب ۱/۰۷۹ و ۱/۰۶۱ برای VPA از روش فلورسانس برای اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل نمایانگر تمایل اتصال ضعیف اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل به Ct-DNA نسبت به BSA است.

طیف CD تغییرات ساختار BSA در حضور اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل را نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، بیضی‌واری مولی مربوط به مارپیچ آلفای موجود در ساختار پروتئین‌های هیستونی در ناحیه ۲۲۰ نانومتر منفی‌تر شده می‌شود. این تغییر نشان می‌دهد که دارو می‌تواند باعث افزایش مقدار پیچه نامنظم در ساختار BSA شود، که در مورد غلظت‌های بالا این تأثیر بیشتر است. تغییر ellipticity مولکول DNA در ناحیه ۲۴۵ نانومتر بیانگر تغییر حالت راستگردی B-DNA می‌باشد. به‌علاوه میانکنش دارو در ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر سبب کاهش ellipticity می‌شود. به‌طور کلی تغییرات در ۲۲۰، ۲۴۵ و ۲۷۵ نانومتر نشان‌دهنده تأثیر دارو بر stacking بازها است که سبب تغییر کانفورماسیون B در ساختار DNA و کاهش ساختارهای دوم مولکول DNA و احتمالاً تغییر B-DNA به A و یا C-DNA می‌شود.

با توجه به نتایج حاصل از میانکنش اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل با Ct-DNA و BSA که حاکی از تمایل زیاد دارو برای اتصال به BSA نسبت به Ct-DNA می‌باشد، احتمالاً درگیر شدن به Ct-DNA و BSA به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین هدف‌های موجود در ساختار کروماتین با اکسیندولین-(H1-تترازول-۵-ایل) استونیتریل می‌باشد.

References:

1. Myznikov LV, Roh J, Artamonova TV, Hrabalek A, Koldobskii GI. Tetrazoles: LI. Synthesis of 5-substituted tetrazoles under microwave activation. Russ J Org Chem 2007;43(5): 765-7.
2. Salahuddin M, Singh S, Shantakumar SM. Synthesis and antimicrobial activity of some novel

- benzo thieno pyrimidines. *Rasayan J Chem* 2009;2(1): 167-73.
3. Sayed Mohamed M, El-Domany RA, Abd El-Hameed RH. Synthesis of certain pyrrole derivatives as antimicrobial agents. *Acta Pharmaceutica* 2009;59(2): 145-58.
 4. Sharma S, Sharma MC, Kohli DV. Design; synthesis and pharmacological investigation of some benzimidazole derivatives 4'-(5, 6-substitued-2-trifluoromethyl-benzoimidazol-1-ylmethyl)-biphenyl-2-carboxylic acid as potent antihypertensive agents. *J Optoelectron Biomed Mater* 2010;2(4): 203-11.
 5. Marcaccini S, Torroba T. The use of the Ugi four-component condensation. *Nat Protoc* 2007;2(3): 632-9.
 6. Rajeswaran WG, Labroo RB, Cohen LA, King MM. Synthesis of 5-[(Indol-2-on-3-yl) methyl]-2, 2-dimethyl-1, 3-dioxane-4, 6-diones and Spirocyclopropyloxindole Derivatives. Potential Aldose Reductase Inhibitors. *J Org Chem* 1999;64(4): 1369-71.
 7. Shanmugam P, Viswambharan B. A Short and Efficient Synthesis of 3-Spiro- α -methylene- γ -butyrolactone Oxindolones from Isomerised Bromo Derivatives of Morita-Baylis-Hillman Adducts. *Synlett* 2008;2008(18): 2763-8.
 8. Shanthi G, Subbulakshmi G, Perumal PT. A new InCl₃-catalyzed, facile and efficient method for the synthesis of spirooxindoles under conventional and solvent-free microwave conditions. *Tetrahedron* 2007;63(9): 2057-63.
 9. Olins DE, Olins AL. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(10): 809-14.
 10. Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 1977;46(1): 931-54.
 11. Gentili PL, Ortica F, Favaro G. Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B* 2008;112(51): 16793-801.
 12. Zhao X N, Liu Y, Niu L Y, Zhao C P. Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with surfactants and apigenin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012;94: 357-64.
 13. Wani TA, Bakheit AH, Ansari MN, Al Majed A RA, Al-Qahtani BM, Zargar S. Spectroscopic and molecular modeling studies of binding interaction between bovine serum albumin and roflumilast. *Drug Des Devel Ther* 2018;12: 2627.
 14. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy: Springer science & business media; 2013.
 15. Månsson R, Hultquist A, Luc S, Yang L, Anderson K, Kharazi S, et al. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 2007;26(4): 407 19.
 16. Kelly SM. TJ Jess i NC Price. *Biochim Biophys Acta* 2005;1751: 119 39.
 17. Freifelder D. Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology: Macmillan; 1982.
 18. Roh J, Vávrová K, Hrabálek A. Synthesis and functionalization of 5 substituted tetrazoles. *Eur J Org Chem* 2012;2012(31): 6101-18.
 19. Malik MA, Wani MY, Al-Thabaiti SA, Shiekh RA. Tetrazoles as carboxylic acid isosteres: chemistry and biology. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2014;78(1): 15 37.
 20. Herr RJ. 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorg Med Chem* 2002;10(11): 3379 93.
 21. Patil DR, Deshmukh MB, Dalal DS. Ammonium acetate mediated synthesis of 5 substituted 1H tetrazoles. *J Iran Chem Soc* 2012;9(5): 799-803.

22. Eicher, Hauptmann S. The Chemistry of Heterocycles: Wiley VCH; 2003.
23. Li X, Deng S, Fu H. Blue tetrazolium as a novel corrosion inhibitor for cold rolled steel in hydrochloric acid solution. Corros Sci 2010;52(9): 2786-92.
24. Khorsandi K, Rabbani-Chadegani A. Investigation on the chromium oxide interaction with soluble chromatin and histone H1: A spectroscopic study. Int J Biol Macromol 2014;70: 57-63.
25. Tanwir A, Jahan R, Quadir MA, Kaiser MA, Hossain MK. Spectroscopic studies of the interaction between metformin hydrochloride and bovine serum albumin. Dhaka Univ J Pharm Sci 2012;11(1): 45-9.

SPECTROSCOPIC EVALUATION OF THE INTERACTION OF A TETRAZOLE DERIVATIVE SYNTHESIZED BY SEMI-GREEN METHOD WITH CALF THYMUS DNA AND BOVINE SERUM PROTEIN

Javad Sargolzaei¹, Soheila Khaghaninejad²

Received: 30 June, 2022; Accepted: 03 December, 2022

Abstract

Background & Aims: In recent decades, the application of tetrazole structures in various fields of medicine and industry has become very important, because they can cause structural and thus functional changes in the proteins. In this article, the effect of a new tetrazole derivative on calf thymus DNA (Ct-DNA) as well as on bovine serum albumin protein (BSA) in the solution was determined using various spectroscopic methods in vitro.

Materials & Methods: The primary, secondary, and tertiary structures of BSA proteins and Ct-DNA were studied using UV-Vis spectroscopy, circular dichroism (CD), and fluorescence spectroscopy, respectively.

Results: The results showed that the optical density of Ct-DNA and BSA were increased in the result of interactions with oxindolin-(H1-tetrazol-5-yl) acetonitrile at 260 and 280 nm. The emission spectra of Ct-DNA and BSA decreased dependent to the concentration of oxindolin-(H1-tetrazol-5-yl) acetonitrile, which indicates the binding of oxindolin-(H1-tetrazol-5-yl) acetonitrile to chromophores in Ct-DNA and BSA. Binding of oxindolin-(H1-tetrazol-5-yl) acetonitrile causes a significant increase in ellipticity, circular dichroism of DNA molecules in the regions of 220 and 275 nm, and increase in its negativity in 245 nm, which shows a stronger binding of oxindolin- (H1-tetrazol-5-yl) acetonitrile to Ct-DNA. As the concentration increases, the molar ellipse associated with the alpha helix in the BSA structure becomes more negative in the 220 nm region, which indicates an increase in the amount of irregular coils in the structure of BSA.

Conclusion: The obtained results can provide useful information in the field of designing drugs with tetrazole derivatives with more anti-tumor effect and less side effects.

Keywords: Bovine Serum Protein, Calf Thymus DNA, Circulation Dictionary Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, Oxindoline-(H1-tetrazol-5-yl) Acetonitrile

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Tel: +989155421808

Email: j-sargolzaei@araku.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 33(6): 403 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran (Corresponding Author)

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran