

ساخت و ارزیابی خواص ضد مس درون سلولی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر در سلول‌های مدل ویلسون (HepG2)

نازله فانی^۱، دکتر مهدی شفیع اردستانی*^۲، دکتر پریچهر یغمائی^۳، آرتین اسدی^۱، امیر بزرگ‌بهرز^۴

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه رادیوفارماسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بیماری ویلسون یک بیماری ارثی متابولیسم مس است و با رسوب بیش از حد مس در کبد و مغز مشخص می‌شود. D-پنی سیل آمین یکی از معروف‌ترین شلاتورهای مورد استفاده در درمان بیماری ویلسون است؛ اما نقص اصلی این دارو ناتوانی آن در ورود به فضای درون سلولی است. این مطالعه به منظور ساخت و ارزیابی خواص ضد مس درون سلولی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر در سلول‌های مدل ویلسون (HepG2) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی دوزهای مختلفی از داروهای دندریمر، D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر به سلول‌های مدل ویلسون تزریق شد. سپس میزان غلظت مس درون سلولی هر یک از گروه‌های سلولی دریافت‌کننده دارو به‌طور جداگانه با دستگاه جذب اتمی بررسی و به روش مقایسه‌ای ارزیابی گردید. غلظت مس درون سلولی با استفاده از نرم‌افزار Pharm و براساس معادله خطی محاسبه شد. سمیت نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر با روش MTT Assay سنجیده شد.

یافته‌ها: گروه‌های سلولی دریافت‌کننده داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). غلظت مس درون سلولی ۶۶/۶۱ تعیین شد. دوز به‌کار رفته برای داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر سمیتی از خود نشان نداد و اثری بر سلول‌های زنده نداشت.

نتیجه‌گیری: نانوکونژوگه کردن D-پنی سیل آمین به‌وسیله دندریمر می‌تواند سبب کاهش مس درون سلولی گردد.

کلید واژه‌ها: بیماری ویلسون، نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر

* نویسنده مسؤول: دکتر مهدی شفیع اردستانی، پست الکترونیکی shafieeardestani@sina.tums.ac.ir

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، تلفن ۶۴۱۲۰-۰۲۱، شماره ۶۶۶۱۱۷۸

رسول مقاله: ۹۳/۵/۲۸، اصلاح نهایی: ۹۳/۱۰/۸، پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۲۱

مقدمه

آمین، تری‌انتین، زینک استات و تترا تیومولیدات است (۲). پنی سیل آمین در واقع یک سیستمین است که در دو ناحیه با گروه‌های متیل جایگزینی صورت می‌گیرد. بیش از ۸۰ درصد پنی سیل آمینی که در ادراغ ترشح می‌شود به صورت کمپلکس با مس دیده می‌شود. همچنین این ماده می‌تواند باعث القای سنتز متالوتیونین شود. متالوتیونین پروتئینی غنی از سیستمین است که به عنوان شلاتور طبیعی در بدن برای فلزات ایفای نقش می‌کند (۳و۴). به دلیل مکانیسم خارج سلولی و عمل غیراختصاصی D-پنی سیل آمین با سایر یون‌های بدن مانند سدیم، پتاسیم و آهن کمپلکس‌های غیرضروری ایجاد می‌کند و باعث بروز عوارض مفصلی، بیماری‌های اتوایمیون و نفروپاتی طی ۳-۱ هفته اول درمان در

بیماری ویلسون یک بیماری ارثی متابولیسم مس است. این وضعیت برای اولین بار توسط Kinnier Wilson در سال ۱۹۱۲ تعریف شد. از آن زمان به بعد مطالعات مرتبط با اختلالات بیوشیمیایی و اختلالات ژنتیکی بسیاری انجام شده است (۱). بیماری ویلسون یک بیماری مادرزادی متابولیسم مس به‌وسیله جهش در ژن انتقال‌دهنده مس (ATP7B) رخ داده و با رسوب بیش از حد مس در کبد و مغز مشخص می‌شود (۱).

داروهایی که برای خروج مس اضافی از بدن استفاده می‌شوند؛ شلاتور نام دارند. این داروها با مس کمپلکس تشکیل داده و از طریق ادراغ دفع می‌شوند. مهم‌ترین داروهای شلاتور شامل پنی سیل

منتقل شد و کیسه به فلاسک حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شد. به مدت دو روز مداوم به هم زده شد و آب خارجی آن بعد از ۲۴ ساعت حذف و ۱۰۰ میلی لیتر آب تازه به آن اضافه شد. در نهایت محلول از کیسه دیالیز خارج و تحت شرایط خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد لیوفلیزه شد و محصول دندریمر به صورت پودر خمیری سفید رنگ به دست آمد.

بر روی ۱۰ mg دندریمر یک میلی لیتر حلال PBS (فسفات بافر سالین) اضافه شد. سپس ۵ میلی گرم EDC (اتیل دی متیل آمینو پروپیل کاردی امید) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه به هم زده شد. سپس ۳/۳ میلی گرم D-پنی سیل آمین اضافه و در ویال محکم بسته شد. به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه برای افزایش سطح تماس به منظور انجام واکنش شیمیایی سریع تر به کمک دستگاه سونیکاتور تکان شدیدی به محلول داده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه محلول کدوری حاصل گردید.

اندازه و بار سطحی دندریمر و نانو کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر توسط دستگاه DLS تعیین شد. در دندریمر اندازه ذرات در حدود ۹۱ نانومتر به دست آمد. اندازه ذرات برای کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر نیز در حدود ۱۱۰ نانومتر به دست آمد. بار سطحی دندریمر و نانو کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر نیز به ترتیب ۳/۳- و ۵/۲+ به دست آمد. بنابراین بار سطحی دندریمرها منفی بود؛ ولی هنگامی که D-پنی سیل آمین به آنها متصل شد؛ دارای بار سطحی مثبت شدند.

در تصویربرداری از نمونه کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر پس از آماده سازی نمونه، ذرات به صورت جداگانه و یکنواخت روی لامل پخش شدند و تصاویر مناسبی از آنها گرفته شد. در حالی که اندازه حاصله با دستگاه Z-Sizer (مدل Nano ZS ساخت شرکت Malvern انگلستان) در همخوانی کامل بود (شکل های ۱ و ۲).

برای مطالعات سلولولی از کشت سلول های رده HEPG2 (کار سینوما ی هپاتوسلولار انسان) استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده DMEM بود. محیط کشت شامل ۵ میلی لیتر FBS ۱۰ درصد، ۰/۵ میلی لیتر مخلوطی از آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین و ۵ میلی لیتر آمینواسید گلوتامین بود (۱۱). تمام این مواد اولیه از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. مخلوط پنی سیلین و استرپتومایسین با مخلوط کردن ۰/۱ گرم استرپتومایسین و ۰/۰۶ میلی گرم پودر پنی سیلین به دست آمد. از نانو کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر برای تعیین اثر دوزهای مختلف داروی تازه سنتز شده بر روی میزان مس درون سلولی و انجام تست های MTT و FTIR نمونه برداری شد. به منظور انجام تست FTIR حدود ۲-۱ mg از مواد شامل دندریمر و D-پنی سیل آمین و نانو کونژوگه

بیماران می شود (۵).

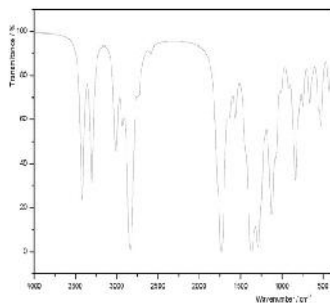
دارویی که در حال حاضر برای درمان بیماری ویلسون به کار می رود D-پنی سیل آمین با برند معروف Cuprimine یا Depen است. این دارو به واسطه دارا بودن گروه تیولی می تواند با کاتیون های دو ظرفیتی از قبیل مس کمپلکس تشکیل داده و آنها را از بدن دفع کند. این کمپلکس محلول در آب بوده و از طریق ادرار از بدن دفع می شود (۶)؛ اما بزرگترین ایراد وارده آن است که سندرم های نورو لوژیک در حدود ۵۰ درصد افراد درمان شده با D-پنی سیل آمین؛ بسیار شدید بروز می کند. از سوی دیگر حدود ۳۰ درصد بیماران در ماه اول واکنش های حساسیتی از قبیل تب، راش و لنفادنوپاتی بروز می دهند که البته معمولاً گذرا هستند (۷ و ۸). همچنین با توجه به اثر خارج سلولی این ترکیب در تشکیل کمپلکس با مس و ناتوانی آن در ورود به سلول به نظر می رسد بخش اعظم عوارضی که در بالا ذکر شد به این علت رخ می دهند. با توجه به این که یکی از کاربردهای نانوپزشکی افزایش رسانش دارویی است؛ در آن با استفاده از مواد نانو مقیاس یا مولکول ها سعی می شود تا میزان فراهمی ریستی داروها افزایش یابد (۹). و دندریمرها یکی از نانو ساختارهایی هستند که امروزه در بسیاری از زمینه های زیست پزشکی مورد توجه قرار گرفته اند (۱۰). این مطالعه به منظور ساخت و ارزیابی خواص ضد مس درون سلولی نانو کونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر در سلول های مدل ویلسون (HepG2) انجام شد.

روش بررسی

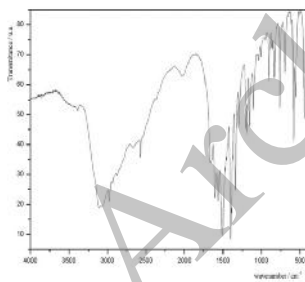
در این مطالعه توصیفی تحلیلی پلی اتیلن گلیکول با نام تجاری Methoxy PEG Maleimide، با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون از شرکت BOC Sciences خریداری شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر FT-IR مدل Nicolet ساخت آمریکا و دستگاه Zeta sizer مدل Nano ZS ساخت شرکت مال ورن انگلستان و دستگاه جذب اتمی مدل Spectr AA 220 ساخت شرکت Varian استرالیا استفاده شد. بر روی ۵ μl پلی اتیلن گلیکول (۰/۰۱ میلی مول PEG)، ۲۸۴ μl (۴ میلی مول) از محلول DMSO (خشک شده با کلرید کلسیم) ریخته شد. سپس بر روی آن ۰/۰۵ gr دی سیکلو هگزیل کربو امید (۰/۰۲۵ میلی مول DCC) به عنوان فعال کننده گروه های کربوکسیل اسید سیتریک اضافه گردید. به مدت ۱۰ دقیقه روی دستگاه بهم زن مغناطیسی گذاشته شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه به مقدار ۰/۰۳ gr اسید سیتریک (۰/۰۱۸ میلی مول اسید سیتریک) وزن کرده و بر روی محلول مورد نظر اضافه شد. سپس به مدت نیم ساعت روی دستگاه بهم زن مغناطیسی گذاشته شد. بعد از گذشت نیم ساعت بر روی آن مقداری آب مقطر اضافه گردید و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول زیری حاوی دندریمر به کیسه دیالیز

نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر از دندریمر و D-پنی سیل آمین پی برده شد. در منحنی FTIR مربوط به ماده دندریمر دو پیک باریک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۵۰۰-۳۲۵۰ نشان‌دهنده حضور دو گروه OH موجود در دندریمر بود. پیک موجود در دامنه طول موجی cm^{-1} ۲۸۰۰-۳۱۰۰ مربوط به عامل CH_2 و پیک موجود در دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۶۰۰-۱۸۰۰ مربوط به گروه COOH دندریمر بود (نمودار یک).

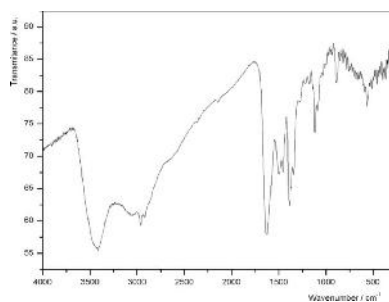
در منحنی FTIR مربوط به ماده D-پنی سیل آمین پیک‌های دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۶۰۰-۲۹۵۰ نشان‌دهنده حضور گروه‌های OH و NH_2 موجود در D-پنی سیل آمین بود. پیک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۲۸۰۰-۳۱۰۰ مربوط به حضور گروه‌های آلیفاتیک (CH_2-CH_3) و پیک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۷۲۰-۱۷۱۰ مربوط به حضور گروه کربونیل C=O موجود در D-پنی سیل آمین بود (شکل ۲).



نمودار ۱: گراف FTIR از ماده دندریمر

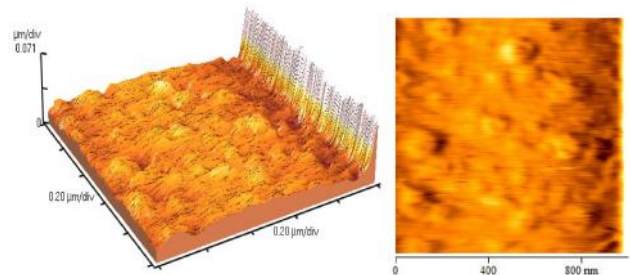


نمودار ۲: گراف FTIR از ماده D-پنی سیل آمین

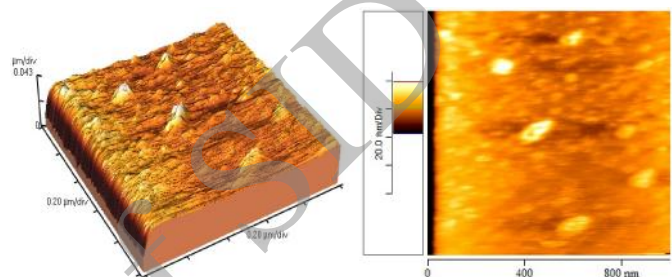


نمودار ۳: گراف FTIR از نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر

D-پنی سیل آمین - دندریمر با میزان ۱۰-۵ میلی گرم پتاسیم بروماید (KBr) مخلوط شد و سپس به صورت قرص درآمد. پتاسیم بروماید در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۵۰۰۰ طیف ندارد (۱۲).



شکل ۱: تصاویر AFM مربوط به دندریمر



شکل ۲: تصاویر AFM مربوط به کانژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر

دوزهای مختلفی از داروهای دندریمر (با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) D-پنی سیل آمین (با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر (با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به سلول‌های مدل ویلسون تزریق شد. سپس میزان غلظت مس درون سلولی هر یک از گروه‌های سلولی دریافت کننده دارو به طور جداگانه با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید.

سمیت دوزهای مختلف از داروهای D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر با روش MTT Assay سنجیده شد.

EC50 تعیین کننده دوز دارویی، حداکثر تا ۵۰ درصد در کاهش رسوب مس موثر است که با استفاده از نرم افزار Pharm و بر اساس معادله خطی $y = -0.1422x + 34.445$ محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های آماری One way ANOVA و t-student تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با مقایسه طیف مادون قرمز دندریمر، D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر به ساخته شدن

گروه های سلولی دریافت کننده داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.05$) (نمودار ۴).

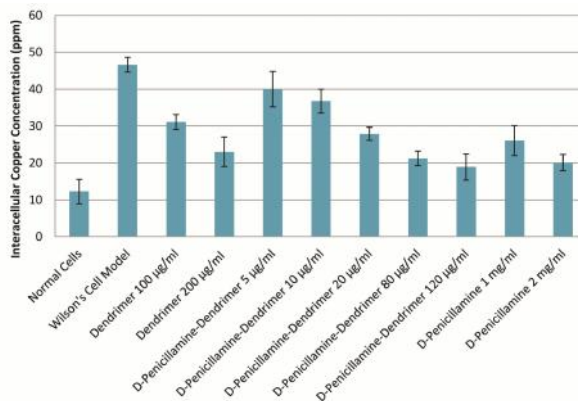
دوزهای به کار رفته برای داروهای D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر سمیتی از خود نشان ندادند و اثری بر سلول های زنده نداشتند (نمودار ۵). غلظت مس درون سلولی ۴۶/۶۱ تعیین شد (نمودار ۶).

بحث

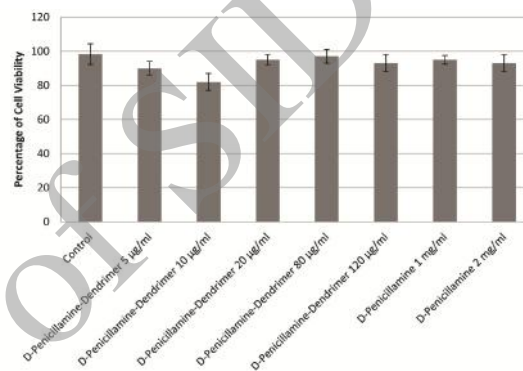
با توجه به نتایج این مطالعه گروه های سلولی دریافت کننده داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند.

در دهه اخیر تحقیقات مختلفی در زمینه نانوپزشکی انجام شده و در حال تبدیل شدن به محصولات تجاری در سراسر دنیا است. در مطالعه Cui و همکاران D-پنی سیل آمین که محصول تخریب پنی سیلین است؛ به عنوان داروی مورد تایید FDA برای شلاته کردن مس در بیماری ویلسون به عنوان شلاتور فلزی در AD آزمایش شد (۱۳). کونژوگه کردن D-پنی سیل آمین با نانو ذرات حاوی 1,2 Dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide] معروف به MPB-PE و pyridylthio-propionylphosphoethanolamine معروف به PDP-PE، D-پنی سیل آمین را قادر می سازد با خاصیت هیدروفیلی بالا از سد خونی - مغزی عبور کند (۱۴).

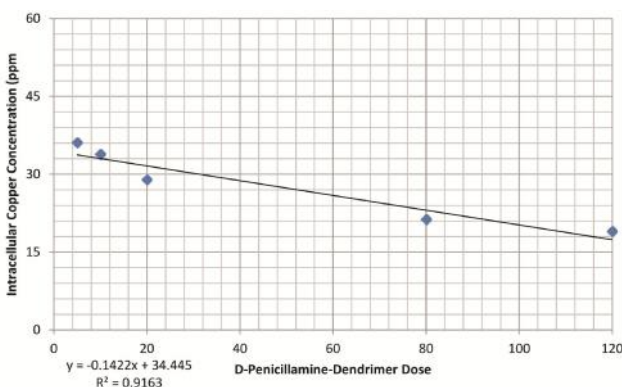
دندریمر مورد استفاده در این تحقیق کوپلیمر ۳ بلبو از نوع CA-PEG-CA است. این دندریمر از یک هسته مرکزی PEG و دو اسید سیتریک در اطراف تشکیل شده است. خصوصیات منحصر به فردی در مقایسه با سایر دندریمرها دارد. دندریمرها پلی مرهای تطبیق پذیر و منعطفی هستند که امروزه به عنوان حامل های مناسبی در سیستم های بیولوژیکی مطرح هستند. در واقع آنها حامل های مناسبی برای انتقال داروهای ضدسرطان، ضدویروس و ضدباکتری با قابلیت افزایش حلالیت داروها هستند. اما این پلی مرها با محدودیت بزرگ سمی بودن در موجودات زنده رو به رو هستند. این سمیت ها به برهم کنش بارهای مثبت دندریمر با بار منفی غشای سلولی در نتیجه تخریب غشا، تشکیل حفره در آن و لیز شدن سلول نسبت داده می شود. سمیت ها شامل سمیت سلولی، خونی، همولیتیک و *in vivo* است (۱۶ و ۱۵). به دلیل اندازه نانودندریمرها ممکن است با اجزای سلولی در دامنه اندازه نانو مانند غشاهای پلاسمایی و اندامک های سلولی (اندوزوم، میتوکندری و هسته) برهم کنش داشته باشند (۱۷). به عنوان مثال دندریمرهایی مثل PPI



نمودار ۴: مقایسه اثر دوزهای مختلف از داروهای دندریمر، D-پنی سیل آمین، نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بر غلظت مس درون سلولی



نمودار ۵: نمودارسنجش سمیت داروهای D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر



نمودار ۶: منحنی EC50

در منحنی FTIR مربوط به نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین - دندریمر در دامنه طول موجی 1700 cm^{-1} پیکی دیده نشد که مبنی بر ترکیب گروه های NH_2 و COOH و ایجاد پیوند آمیدی موجود در نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بود. پیکی که در دامنه طول موجی 1600 cm^{-1} دیده شد؛ مربوط به حضور پیوند آمیدی موجود در نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بود (شکل ۳).

یک دندریمر زیست تخریب‌پذیر است و سمیت قابل ملاحظه‌ای ندارد. این دندریمر بار منفی دارد. بنابراین با بار منفی سطح سلول برهم کنش ندارد و غشای سلولی را تخریب نمی‌کند (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکونژوگه کردن D-پنی سیل آمین به‌وسیله دندریمر می‌تواند سبب کاهش مس درون سلولی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم نازیله فانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی - بیوشیمی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود. بدین‌وسیله از حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه علوم پزشکی تهران و همه یاری‌کنندگان این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Das SK, Ray K. Wilson's Disease: An Update. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(9):482-93.
2. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007 Feb; 369(9559):397-408.
3. Iorio R, D'Ambrosi M, Marcellini M, Barbera C, Maggiore G, Zancan L, et al. Serum transaminases in children with Wilson's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Oct;39(4):331-6.
4. Sternlieb I. Wilson's Disease and pregnancy. *Hepatology*. 2000 Feb; 31(2): 531-32.
5. Albert C, Aynard B, Terbe V. D-Penicillamine induced rapidly progressive glomerulonephritis with membranous nephropathy in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1994; 12(Suppl 11): 108.
6. Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. 1st. Washington D.C: Nature. 2004; pp: 710-50.
7. Reux B, Weber V, Galmier MJ, Borel M, Madesclaire M, Madelmont JC, et al. Synthesis and cytotoxic properties of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2008 May; 16(9):5004-20. doi: 10.1016/j.bmc.2008.03.038
8. McCarthy TD, Karellas P, Henderson SA, Giannis M, O'Keefe DF, Heery G, et al. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm*. 2005 Jul-Aug;2(4):312-8.
9. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010 Dec; 363(25):2434-43. doi: 10.1056/NEJMra0912273
10. Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(1):199-208.
11. Mashayekhi M, Amanlou M, Sadeghi K, Mosayebniya M, Ardestani M, Shafiee Mehravi B. Diethylentriaminepentaacetic

PAMAM و PLL به دلیل وجود بارهای مثبت بر روی خود دارای سمیت *in vitro* هستند (۱۸). علاوه بر این دندریمرهای ساده، کوپلی‌مرهای سنتزی بلوکه مانند Pluronic زیست تخریب‌ناپذیر بوده و در بدن ایجاد سمیت می‌کنند (۱۹). دو استراتژی کلی برای کاهش سمیت دندریمرها وجود دارد. استراتژی اول طراحی و سنتز دندریمرهای زیست تخریب‌پذیر با استفاده از هسته زیست تخریب‌پذیر و واحدهای شاخه‌دار یا استفاده از حدواسط‌های مسیره‌ای متابولیک است. استراتژی دوم مهندسی سطح مولکولی است که با استیل‌دار کردن کردن مولکول، PEG دار کردن، کربوهیدرات‌دار انجام می‌شود (۱۶). در سنتز دندریمر مورد استفاده در این تحقیق از هر دو استراتژی بالا کمک گرفته شد. در هسته مرکزی این دندریمر از PEG استفاده شده (مهندسی سطح مولکولی) و واحدهای اطراف آن اسیدسیتریک (حدواسط‌های چرخه کربس) هستند (استراتژی اول). به این ترتیب دندریمر حاصل

Acid-deoxyglucoseamine (DTPA-DG): Novel Nanosized Anti-Wilson's Disease Cell Model. *Am J Biomed Sci*. 2013 Jan; 5(1):34-46.

12. Granqvist CG, Buhrman RA, Wyns J, Sievers AJ. Far-Infrared absorption in ultrarare particles. *Phys Rev Lett*. 1976; 37(10): 625. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.37.625>
13. Cui Z, Lockman PR, Atwood CS, Hsu CH, Gupte A, Allen DD, et al. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Feb;59(2):263-72.
14. Adelman HM, Winters PR, Mahan CS, Wallach PM. D-penicillamine-induced myasthenia gravis: diagnosis obscured by coexisting chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med Sci*. 1995 Apr;309(4):191-3.
15. Sperling RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2008; 37(9): 1896-908. doi: 10.1039/B712170A
16. Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm*. 2010 Jul; 394(1-2):122-42. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.04.027
17. Kolhatkar RB, Kitchens KM, Swaan PW, Ghandehari H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjug Chem*. 2007 Nov-Dec;18(6):2054-60.
18. Namazi H, Adeli M. Novel linear-globular thermoreversible hydrogel ABA type copolymer from dendritic citric acid as the A blocks and poly (ethylene glycol) as the B block. *European Polymer Journal*. 2003; 39(7): 1491-1500. doi: 10.1016/S0014-3057(02)00385-3
19. D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Dec;57(15):2147-62.

Original Paper

Synthesis and anti-intracellular Copper overload evaluation of Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer in Wilson’s model cells

Fani N (M.Sc)¹, Shafiee Ardestani M (Ph.D)*², Yaghmaei P (Ph.D)³
Assadi A (M.Sc)¹, Barzegar Behrouz A (M.Sc)⁴

¹Department of Biochemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ²Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ⁴M.Sc in Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Wilson’s disease (WD) is caused by mutation to the cooer-transporting gene ATP7B. Chelation therapy is the main protochol of treatment for patients with Wilson’s disease. D-penicillamine is one of the well-known chelator agants which is used in WD treatment but it can not enter into the intracellular space. This study was done to evaluate the synthesis and anti-intracellular Copper overload evaluation of Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer in Wilson’s model cells.

Methods: In this descriptive-analytic study, initially 0.01 mm polyethylene glycol (PEG) and 0.0018 mm citric acid, Dendrimer was synthesized. After purification by dialysis bag and lyophilization, 10mg dendrimer was conjugated to 3.3mg D-penicillamine. Nanoconjugated D-penicillamine-dendrimer was injected on Wilson’s model cells. After incubation and centrifugation intracellular measurement of copper concentration and FTIR test were done.

Results: Copper accumulation significantly reduced in the HepG2 WD cell by Nanoconjugated D-penicillamine - Dendrimer in compared to D-penicillamine (P<0.05). Copper accumulation was determined to be 46.61. MTT assay showed no toxicological damage in HepG2 WD cell.

Conclusion: Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer can reduces intracellular concentration of Copper.

Keywords: Wilson’s Disease, Nanoconjugated D-penicillamine-dendrimer

* **Corresponding Author:** Shafiee Ardestani M (Ph.D), E-mail: shafieeardestani@sina.tums.ac.ir

Received 19 Aug 2014

Revised 29 Dec 2014

Accepted 11 Jan 2015