



تعیین اثرات سیتوتوکسیسیته داروی متی سیلین کونزوگه با نانولوله کربنی تک دیواره

افسانه احدنژاد^۱، انوش اقدامی^۲، محمد مجید مجتهدی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گروه میکروبیولوژی، ساوه، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گروه بیوشیمی، ساوه، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گروه شیمی، ساوه، ایران

Afsaneh.ahadnejad@yahoo.com

چکیده:

زمینه و هدف: توانایی نانولوله های کربنی در عبور از غشای سلولی به عنوان حامل در انتقال دهی دارو بسیار مورد توجه می باشند، گروه وسیعی از مولکولها می توانند به نانولوله ها متصل شوند و به راحتی به سمت سلولها حرکت کنند. نانولوله ها سمیت بالایی ندارند و در دوزهای پایین برای سلولها بی ضررند ولی در غلظت های بالا باعث از بین رفتن سلولها می شوند و باید اثرات آن در بدن مورد مطالعه قرار گیرند، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیسیته داروی متی سیلین کونزوگه با نانولوله کربنی تک دیواره انجام شد. مواد و روش ها: در این روش پس از اتصال نانولوله کربنی تک دیواره (SWNT) به آنتی بیوتیک متی سیلین که به وسیله روش (jiang et al, 2003) انجام شد و اطمینان از اتصال با استفاده از طیف سنج FT-IR سمیت سلولی نانو دارو با روش MTT بررسی گردید. یافته ها: پیک های طیف سنج FT-IR نشان دهنده این است که اتصالات جدید صورت گرفته و بیانگر اتصال متی سیلین به SWNT می باشد، و در بررسی سمیت سلولی نیز از غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ درصد سلولهای زنده به 80% افزایش یافته است. نتیجه گیری: مطالعات انجام شده بیانگر این است که روش اتصال نانولوله به آنتی بیوتیک روش موثری بوده و اتصال به درستی صورت گرفته است و نانو دارو تهیه شده در غلظت های پایین دارای اثر سمی بر روی سلولهای L929 نمی باشد. کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک متی سیلین، نانولوله کربنی تک دیواره، سمیت سلولی (MTT).

مقدمه:

نانو لوله های کربنی اولین نسل محصولات نانو هستند که در سال ۱۹۹۱ کشف و به جهان عرضه شدند، Damm et al (2007) شکل خاصی از مولکولهای کربن می توانند به خوبی وارد هسته سلولها شوند و می توان در آینده ای نزدیک از آنها در سیستم داروسازی و واکسیناسیون استفاده کرد امروزه از این مولکولهای کربن که نانو لوله های کربنی (Carbon nano tubes) نامیده می شوند تنها جهت حمل پپتیدهای کوچک به هسته های سلولهای فیبروپلاستی استفاده می شود، Sanpui et al (2008) مقاومت دارویی یک مشکل رو به گسترش سیستم سلامت در سطح دنیا است که در اثر استفاده نامناسب از آنتی بیوتیک ها، تغییرات کروموزومی و تبادلات ژنتیکی از طریق پلاسمید یا ترانسپوزون ها رخ می دهد (Benn (2008), Stoimenov et al (2002). نانولوله کربنی در بسیاری از مطالعات قادر است از عرض غشای سلولی عبور کند. توانایی نانولوله های کربنی در عبور از غشای سلولی به عنوان حامل در انتقال دهی دارو بسیار مورد توجه می باشد. به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی نانو لوله های کربنی، به عنوان مواد زیست پزشکی بالقوه برای انتقال



ماکرو مولکول ها زیستی و شیمیایی به داخل سلول و سیستم های زنده جهت درمان و تشخیص در نظر گرفته می شود (Wilson(2008). اندازه گیری قابلیت زیستی (Viability) و تکثیر سلولی (cell proliferation) اساس بسیاری از روش های بررسی پاسخ سلولی به فاکتورهای خارجی را تشکیل می دهد. در حال حاضر احیاء نمک تترازولیوم روشی مطمئن و کم هزینه، برای بررسی تکثیر سلولی و تجزیه و تحلیل آثار سمیت مواد، بر روی سلول ها است. نانولوله کربنی تک دیواره (نانو دارو) در غلظت های مختلف دارای اثرات متفاوتی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین دارا بودند که قابلیت زیستی آنها بر سلول L929 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

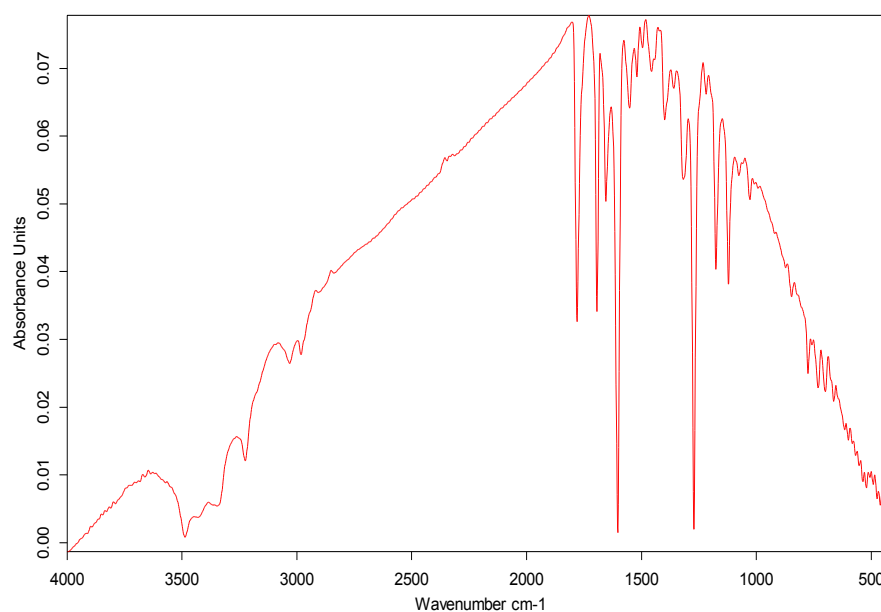
روش تحقیق علمی و روش مطالعه دو شاهد از نوع توصیفی به جهت اثر، متغیر مستقل بر وابسته بوده که در آن متغیر وابسته میزان مرگ سلول و متغیر مستقل داروی متصل شده به نانولوله کربنی تک دیواره می باشد. جامعه ی هدف در این تحقیق سلولهای فیبروبلاست سالم (L929) کشت شده تیمار شده با آنتی بیوتیک کونژوگه به نانو لوله کربنی تک دیواره بودند. جامعه در دسترس شامل ۱۰۰۰۰ سلول L929 کشت داده شده برای انجام آزمایشات MTT بود. در این مطالعه برای اتصال آنتی بیوتیک به نانو لوله کربنی تک دیواره از روش ارائه شده توسط Jiang (۲۰۰۳) استفاده می شود. با استفاده از عاملدار کردن نانولوله کربنی تک دیواره و فعالسازی گرو کربوکسیل با استفاده از اسید نیتریک و اسید سولفوریک و سپس طی فرایند دو مرحله ای استفاده از edac برای ایجاد گروه های فعال و NHS برای ایجاد یک پیوند انیدریدی پایدار با آنتی بیوتیک متی سیلین انجام شد و برای اطمینان از اتصالات صورت گرفته از دستگاه طیف سنج FTIR استفاده شد. برای بررسی سمیت سلولی از تست MTT استفاده شد که در این روش از سلولهای فیبروبلاستی L929 استفاده شد که پس از تهیه سوسپانسیون سلولی آنها در داخل میکروپلیت ریخته و انکوباسون به مدت ۱۲-۲۴ ساعت انجام شد و سپس در مجاورت نانودارو تهیه شده قرار گرفت و انکوباسیون ۲۴ ساعت صورت گرفت و پس از افزودن رنگ MTT و انکوباسیون ۴ ساعته با کمک میکروسکوپ اینورت حضور رسوب ارغوانی رنگ نقطه ای را بررسی نموده و در صورت مشاهده رسوب ارغوانی زیر میکروسکوپ محلول DMSO به هر چاهک اضافه شده پس از پایان مدت انکوباسیون توسط اسپکتروفوتومتر در ۵۷۰ نانومتر نتایج خوانده شد.

یافته ها:

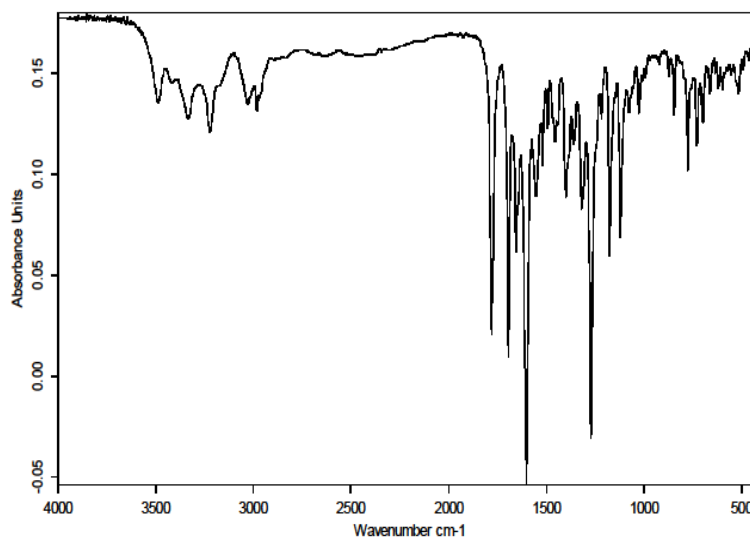
در طیفهای گرفته شده به وسیله طیف سنج FT-IR طیف 1 طیفی از آنتی بیوتیک متی سیلین را نشان می دهد، حضور عاملی آمیدی، لاکتوم و اسید بخوبی در ۳۵۰۰ (COOH)، ۳۳۰۰ (CONH) و سه پیک در نواحی ۱۶۹۰ (CONH)، ۱۷۰۰ (CON) و ۱۸۰۰ (COOH) مشاهده می شود. در طیف ۲ مربوط به طیف نانولوله کربنی تک دیواره (swnt) می باشد پیک های مشاهده شده در نواحی ۱۶۰۰ و ۱۳۵۰ و ۴۵۰ دیده می شود که مربوط به گروه های کربن با پیوند دوگانه و تک می باشد. طیف ۳ مربوط به نانو لوله کربنی عاملدار شده می باشد. پیک پهن در ۳۴۵۰ (COOH) و ۱۷۰۰ (COOH) سانتی متر منفی یک حضور گروه عاملی کربوکسیلیک اسید در نانو لوله به وضوح مشاهده می شود.



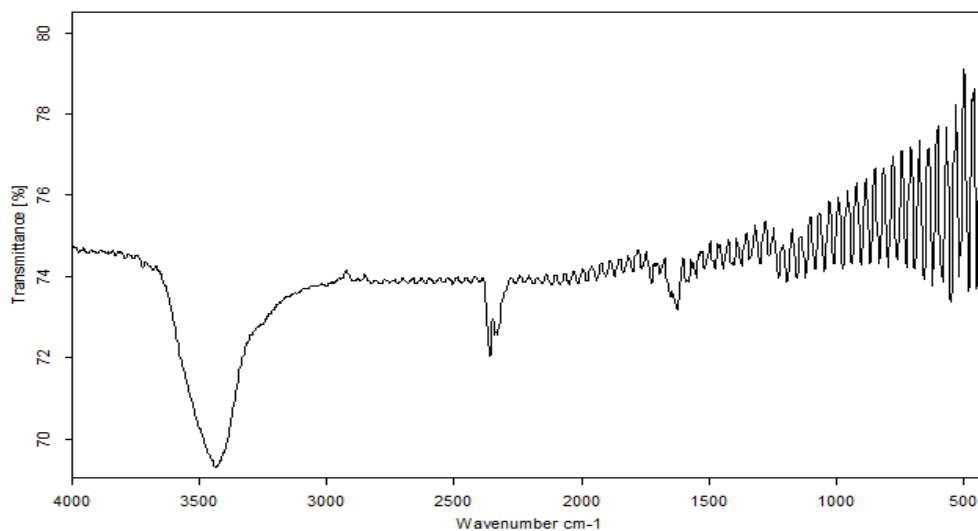
و در طیف ۴ اتصال نانولوله کربنی تک دیواره به آنتی بیوتیک متی سیلین، پیک‌ها در نواحی ۱۵۱۱ و ۱۲۰۹ و ۱۰۳۹ و ۷۳۹ می باشد که نشان دهنده این است که عامل اسیدی در ۳۳۰۰ از بین رفته و ۱۷۰۰ به ۱۵۱۱ تبدیل شده که بدین معنا است که اتصالات جدید صورت گرفته و گروه انیدرید ایجاد شده است و طیف در نواحی ۷۳۹ و ۱۲۰۹ بیانگر اتصال متی سیلین به SWNT می باشد.



طیف ۱: طیف متی سیلین

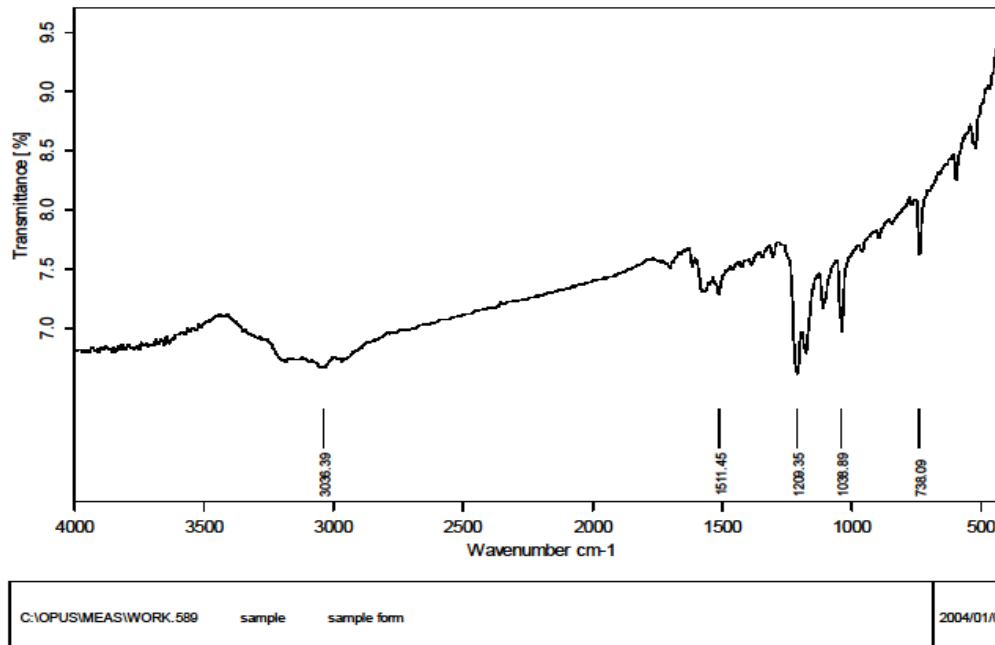


طیف ۲: طیف نانولوله کربنی



C:\OPUS\MEAS\WORK.560	sample	sample form	2003/12/13
-----------------------	--------	-------------	------------

طیف ۳: طیف نانولوله کربنی عاملدار شده



طیف ۴: طیف نانولوله کربنی متصل به آنتی بیوتیک متی سیلین

. در بررسی نتایج MTT در نمودار 1 درصد سلولهای زنده در ۱۶ رقت مورد استفاده از ۴۰۰۰ تا ۰,۱۲۲ (میکروگرم \square میلی لیتر) نانو دارو تهیه شده نشان می دهد که نانو داروی تولید شده روی سلولهای L929 تا حدودی دارای خاصیت سمی بوده و از رقت $125 \mu\text{g/ml}$ سلولها به رشد ۵۰٪ رسیده و از این رقت به بعد از میزان سمیت دارو کاسته می شود و سلولها شروع به رشد می نمایند.



نمودار 1: درصد سلولهای زنده در روش MTT

بحث و نتیجه گیری:

نانو لوله های کربنی در بین مولفه های امید بخش برای کاربردهای متعدد می باشد چون دارای ویژگی های منحصر بفرد می باشند. آنها جایگزین های جدید و کارآمدی برای جایجایی مولکول های درمانی می باشند چون می توان به راحتی از طریق غشای سلول می توانند وارد هسته و سیتوپلاسم گردند، بدون اینکه واکنش میونوژنی و تاثیرات سمی داشته باشد. در حالیکه کربن های آغازین در تمام وقایع غیر محلول هستند عامل دار کردن آلی نانو لوله های کربنی برای قابل حل شدن آنها و تاثیر گذاری سیستمهای زیستی پیش شرط محسوب می شود. (Vossough et al (2008)

سی دریک کلمپ و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعات خود بیان کردند با توجه به این که نانولوله های کربنی دارای توانایی نفوذ به داخل سلول می باشند پس از کاربردی شدن نانو لوله ها از طریق اتصالات کوالانسی یا غیر کوالانسی با ترکیبات مورد نظر یا مولکولهای فعال می توانند به عنوان انتقال دهنده دارو برای درمان مورد استفاده قرار گیرند (Ce'dric Klumpp(2005).

وثوقی و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود بیان کردند به عنوان یک آنتی بیوتیک مولکولی درمانی آمفوتریسین B را می توان از طریق نانو لوله های کربنی انتقال داد (Vossough et al (2008). انصاری و همکاران (۱۳۹۲) از روش رنگ سنجی MTT برای بررسی سمیت

کورکومین-PLGA استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که نانو ذرات کورکومین-PLGA هیچ گونه اثر سمی بر روی سلولهای طبیعی ندارند. همچنین سلولهای تیمار شده با بالاترین غظت توسط نانو ذرات بیش از ۷۵٪ زنده ماندند.^(۱)

پژوهش انجام گرفته نانو آنتی بیوتیک تهیه شده با غلظتهای مختلف روی رده سلولی L929 مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص گردید که با توجه به مقایسه کنترل مثبت و کنترل منفی و سلولهای مورد آزمایش این نانو آنتی بیوتیک روی این



سلولها در رفتهای پایین اثر کشندگی ندارد و می تواند در آینده با تحقیقات بیشتر به عنوان یک نانو دارو مورد استفاده قرار گیرد.

منابع:

۱. انصاری. الف. ۱۳۹۳، بررسی اثر ضد باکتریایی نانو کورکومین در برابر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شرایط پیش بالینی: مجله دنیای میکروب ها. سال ۷. شماره ۱. صفحات ۲۶-۱۸
2. Benn, T.M and Westerhoff, P.(2008) Nano particle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ. Sci. Technol. 42:4133-4139.
3. Ce'dric Klumpp a,b, Kostas Kostarelos c, Maurizio Prato b, Alberto Bianco. 2005. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics.
۴. Damm, C., Munstedt, H. & Rosch, A. (2007). Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. Journal of Materials Science, 42, 6067-6073
5. Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P. V. D., Ghosh, S. S. & Chattopadhyay, A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. International Journal of Food Microbiology, 124, 142-146
6. Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L. & Klabunde, K. J. (2002). Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. Langmuir, 18, 6679-6686.
7. Vossoughi, M. Gojgini. Sh. Kazemi. a. Alemzadeh. i. Majid. Z. Conjugation of Amphotericin B to Carbon Nanotubes via Amide-Functionalization for Drug Delivery Applications. Engineering Letters, 17:4, EL_17_4_12.
8. Wilson M. Bacteriology of humans: an ecological perspective' 2008- Malden, MA: Blackwell Wilson's T. Microbiology and microbial infections. 1 lth ed Arnold pub, New York. 2010; Vol 2.