

بررسی میان کنش نانومیله طلا با آنزیم کندرواتیناز با رویکرد طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو برای ترمیم ضایعات نخاعی

خلاصه

هدف: مطالعه میان کنش نانومیله طلا با غلظت‌های گوناگون آنزیم کندرواتیناز به منظور بهینه کردن نانومیله طلا با رویکرد سامانه هدفمند حامل دارویی برای بهبود روند بازسازی اکسون‌ها و ترمیم ضایعات نخاعی.

روش بررسی: نانومیله طلا با روش رشد دانه سنتز شد و مطالعات ساختاری و مورفولوژی نانومیله طلا و بررسی رزونانس پلاسمون سطحی با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات پلاسمونیک رزونانس سطحی نانومیله طلا در اثر میان کنش با غلظت‌های مختلف آنزیم توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی، فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی بررسی شد. همچنین فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف نانومیله طلا، برای طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو انجام شد.

یافته‌ها: تغییرات پلاسمونیک نانومیله طلا برای بهبود در نقش حامل دارویی نشان داد که اضافه کردن آنزیم و میان کنش آنزیم با نانومیله طلا نه تنها منجر به ازدست رفتن ساختار نانومیله طلا نمی‌شود بلکه مطالعات فلورسانس نشان داد که می‌تواند سبب تقویت شدت سیگنال فلورسانس نیز شود. از طرف دیگر مطالعات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانومیله طلا، نشان داد که دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ نانومولار نانومیله طلا بهترین نتیجه را در زمینه فعالیت آنزیم و حفظ ساختار نانومیله طلا دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: از کاربردهای نانومیله طلا استفاده از آن در عرصه‌های پزشکی و درمانی به عنوان سامانه انتقال دارو است و یکی از آنزیم‌های کلیدی که برای درمان ضایعات نخاعی استفاده می‌شود، آنزیم کندرواتیناز است. مطالعات نانومیله طلا در حضور غلظت‌های مختلف آنزیم نشان داد که علاوه بر عدم از بین رفتن ساختار، افزایش سیگنال فلورسانس برای کاربردهای حسگری نیز مشاهده شد. همچنین با توجه به مطالعات فعالیت آنزیم، غلظت ۱۲/۵ نانومولار نانومیله طلا برای طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو برای این آنزیم مفید به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: نانومیله طلا، آنزیم کندرواتیناز، سامانه انتقال دارو

مینا سادات نادری^۱
طاهره توحیدی مقدم^۲
خسرو خواجه^۳
بیژن رنجبر^۴

۱. گروه پژوهشی ترمیم نوری، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده مسئول: بیژن رنجبر. تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۴۱۸
پست الکترونیک: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

حوزۀ نانوتکنولوژی در زمینه انتقال دارو و درمان های ضد سرطان در دهه های اخیر به موفقیت چشمگیری دست یافته است. نانوساختار طلا نسبت به سایر نانوساختارها کاربرد بیشتری پیدا کرده است و این امر می تواند به علت خاصیت پلاسمونیک قوی تر و همچنین قابلیت سازگاری زیستی بالای آن ها باشد [۱]. از ویژگی های منحصر به فرد نانوذرات طلا جذب و پراکندگی قوی در ناحیه مرئی - فرابنفش از طیف الکترومغناطیسی است، به طوری که در طول موج ۷۰۰ تا ۱۲۰۰ نانومتر می تواند جذب داشته باشد و این به دلیل خاصیت پلاسمونیک قوی نانوذرات طلا است [۲]. از دیگر ویژگی های منحصر به فرد نانومیله های طلا حساسیت نسبت به تغییرات ثابت دی الکتریک مواد اطراف نانوذره است به طوری که از نانوذرات می توان برای سنسور ها و حسگرهای شیمیایی در محیط آزمایشگاهی استفاده کرد [۳]. اندازه و شکل ذرات با توجه به پروتکل های سنتزی متفاوت خواهد بود به طوری که اندازه آن ها می تواند بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تغییر کند. سطح زیاد این نانوذرات از ویژگی های دیگر می باشد که برای بارگذاری داروها مفید است بنابراین انحلال پذیری، پایداری و همچنین پارامترهای کینتیکی داروها را تحت تأثیر قرار می دهد [۲]. با توجه به این که نانومیله های طلا مورفولوژی آنیزوتروپیک و غیریکنواخت دارند، برای کاربردهای زیست پزشکی و کاربردهای زیست حسگری مفید هستند [۴].

کندروآتین سولفات گلیکان ها، کلاس اصلی از م هار کننده های رشد آکسون ها هستند که مقدار آن هنگام جراحات ستون فقرات و نخاع افزایش می یابد و تأثیر منفی در بهبودی و بازیابی آکسون ها خواهند داشت. آنزیم کندروآتیناز اثر م هاری گلیکوز آمینو گلیکان ها را با هضم آن ها از بین می برد و به این ترتیب سبب ترمیم و بهبودی جراحات نخاعی می شود [۵]. درواقع آنزیم کندروآتیناز، زنجیره های گلیکوز آمینو گلیکان را در پروتوگلیکان ها هضم می کند و بدین ترتیب بازیابی آکسون و بهبودی عملکردی را افزایش می دهد [۶]. با وجود اهمیت فراوان این آنزیم، عدم پایداری از جمله محدودیت های آن در کاربردهای پزشکی است. بنابراین، پایداری سازی این آنزیم به شدت مورد توجه محققان قرار گرفته است [۷]. در زمینه میان کنش نانومیله طلا با پروتئین ها مطالعاتی صورت گرفته است. از جمله این مطالعات، بررسی میان کنش آنزیم لیزوزیم با نانومیله طلا است که براساس آن پایداری سینتیکی آنزیم افزایش می یابد [۸]. البته میان کنش و جذب سطحی ممکن است باعث برخی تغییرات کنفورماسیونی نامطلوب در ساختار بیومولکول ها شود که به تغییر در فعالیت منجر می گردد. بررسی ساختاری و عملکردی آنزیم لیزوزیم در طی اتصال با نانوساختار اکسید روی نشان می دهد که آنزیم در طی اتصال با نانوساختار اکسید روی دستخوش تغییرات اندکی در کنفورماسیون می شود درحالی که فعالیت آنزیم تغییر چندانی نمی کند [۹]. پاسخ پروتئین بستگی به طبیعت پروتئین و سطح شیمیایی نانوساختار دارد. از تحقیقات دیگر

انجام شده در زمینه میان کنش با نانومیله طلا، پروتئین آلبومین است که نتایج حاصل نشان دهنده تغییرات نامحسوس در کنفورماسیون آنزیم است [۱۰].

مطالعه میان کنش آنزیم کندروآتیناز با نانومیله های طلا می تواند راه کار جدیدی برای انتقال این آنزیم باشد، به طوری که در حضور کمپلکس آنزیم - نانومیله های طلا (نسبت به استفاده از آنزیم به تنهایی) غلظت کمتری از آنزیم جهت درمان نیاز خواهد بود و بنابراین این سامانه (در صورت تحقیقات بیشتر در سطح حیوانی و انسانی) می تواند مراجعه بیمار را برای دریافت آنزیم کاهش دهد [۳]. در این مطالعه تغییرات ساختاری و نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله های طلا در اثر میان کنش با غلظت های مختلف آنزیم جهت بهینه سازی سامانۀ انتقال دارو در ترمیم ضایعات نخاعی در جهت بازسازی رشد آکسون ها بررسی شد.

روش کار

۱. ساخت نانومیلۀ طلا

نانومیله های طلا با روش تکنیک رشد روی ذرات دانه^۱ طی دو مرحله ساخت دانه^۲ و مرحله رشد سنتز^۳ شدند. در مرحله اول ۲۵۰ میکرولیتر نمک طلا HAuCl_4 با غلظت ۰/۰۱ مولار را به ۷/۵ میلی لیتر از CTAB با غلظت ۰/۰۹۵ مولار اضافه گردید و بلافاصله ۶۰۰ میکرولیتر محلول HAuCl_4 سرد (Ice-cold) اضافه شد. پس از گذشت زمان حداقل ۲ ساعت در دمای اتاق، دانه ها تشکیل شدند.

در مرحله رشد ابتدا ۹/۵ میلی لیتر محلول CTAB (۰/۰۹۵ مولار) تهیه و سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول نمک طلا HAuCl_4 با غلظت ۰/۰۱ مولار و ۶۰ میکرولیتر محلول AgNO_3 با غلظت ۰/۰۱ به آرامی اضافه گردید و در نهایت با افزودن اسید آسکوربیک و ۴۰ میکرولیتر از محلول دانه از مرحله قبل، در بازۀ زمانی سه ساعت در شرایط آزمایشگاه نانومیله های طلا سنتز شدند [۱۱ و ۱۲].

۲. تخلیص نانومیله های طلا و پایش نوسانات پلاسمون سطحی با استفاده از دستگاه طیفسنجی مرئی فرابنفش

برای تخلیص نانومیله های طلا دوبار سانتریفیوژ و به مدت ۵ دقیقه و با $12500 \times g$ انجام شد. پس از هر بار سانتریفیوژ، محلول رویی خارج گردید و نانوذرات ته نشین شده با آب دیونیزه به غلظت مورد نظر رسانده شد. پس از سونیکاسیون به مدت ۱ دقیقه، جهت تأیید ساخت نانوذرات طلا با مرفولوژی میله ای از طیفسنجی فرابنفش - مرئی در گسترۀ طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر Carry-۱۰۰ استفاده شد [۱۳].

۱. Seed mediated growth protocol

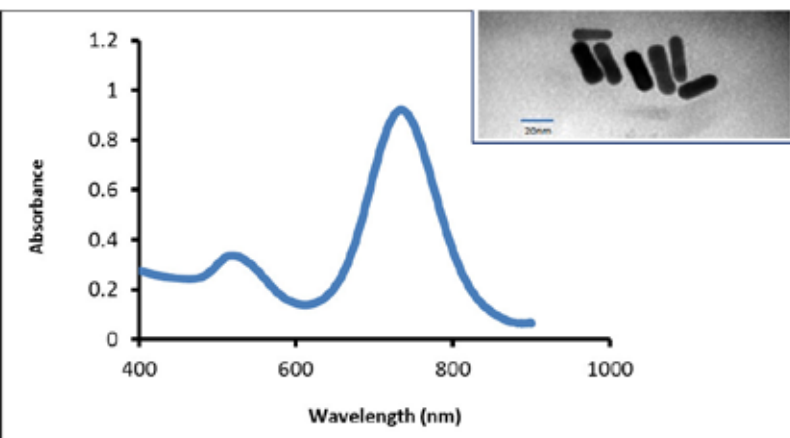
۲. Seed

۳. Growth

یافته‌ها

۱. بررسی ساخت نانومیلۀ طلا و نوسانات پلاسمون سطحی آن

ساده‌ترین راه برای تأیید ساخت نانومیله‌های طلا، بررسی طیف جذبی آن‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش است. نانومیله‌های طلا در اثر میان‌کنش با پرتوهای الکترومغناطیس به علت داشتن دو سطح متفاوت طولی و عرضی به صورت‌های مختلفی نوسان می‌کنند. همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود دو پیک جذبی مشاهده می‌شود که پیک اول در طول موج ۵۳۰ نانومتر مربوط به سطح عرضی آن و پیک جذبی دوم در طول موج ۷۵۰ نانومتر مربوط به سطح طولی نانوساختار است که بیانگر سنتز نانوذرات به شکل میله‌ای می‌باشد. همچنین تأیید نهایی مورفولوژی نانومیله طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که اندازه طولی آن 30 ± 2 نانومتر و اندازه عرضی آن 8 ± 2 نانومتر است (شکل ۱).



شکل ۱: طیف جذبی نانومیلۀ طلا علیه طول موج در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۶/۸ و تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیلۀ سنتز شده

شکل ۲ نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله طلا را در حضور و عدم حضور غلظت‌های متفاوت آنزیم نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، کاهش طیف نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با غلظت‌های مختلف پروتئین رخ داده است به گونه‌ای که با افزایش غلظت پروتئین میزان شدت نوسانات پلاسمونیک سطحی نانومیله طلا نیز کاهش می‌یابد [۱۷ و ۱۸].

برای بررسی تفاوت بار نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با آنزیم کندروآتیناز پتانسیل زتا مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بعد از سنتز نانومیله طلا و تخلیص آن، پتانسیل زتای بدست‌آمده برای نانومیله طلا ۴۰ میلی‌ولت بود و با اضافه کردن آنزیم، این مقدار به ۱۶/۵+ میلی‌ولت کاهش پیدا کرد. شکل ۳ نشان‌دهنده پتانسیل زتا و تفاوت بار نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با غلظت‌های مختلف آنزیم است. هرچه غلظت آنزیم افزایش می‌یابد پتانسیل زتا نانومیله طلا نیز کاهش می‌یابد. این کاهش بار با نتایج

۳. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیلۀ طلا

برای تأیید نهایی مورفولوژی و همچنین ارزیابی اندازه دقیق، نانوذرات روی شبکه مسی (گرید) پوشیده از کربن قرار گرفتند و بعد از خشک شدن در شرایط محیط با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO ۹۰۶ آلمان (دانشگاه خواجه نصیر) تصویربرداری انجام شد.

۴. میان‌کنش آنزیم-نانومیلۀ طلا

برای بررسی میان‌کنش آنزیم-نانومیله طلا، نسبت ۱:۱ از آنزیم (غلظت ۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و نانومیله طلا (غلظت ۱۲/۵ نانومولار) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. برای تأیید و بررسی میان‌کنش آنزیم-نانومیله طلا از تکنیک‌های زیر استفاده شد:

۱-۴. پتانسیل زتا

برای بررسی تفاوت بار بین نانومیله طلا و نانومیله طلا-آنزیم (۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پتانسیل زتا استفاده گردید. به این ترتیب که پس از تخلیص نانومیله طلا، تفاوت بار آنزیم-نانومیله طلا و نانومیله طلا به تنهایی (به عنوان کنترل) با دستگاه MALVERN Nano-ZS اندازه‌گیری شد.

۲-۴. مطالعات فلورسانس

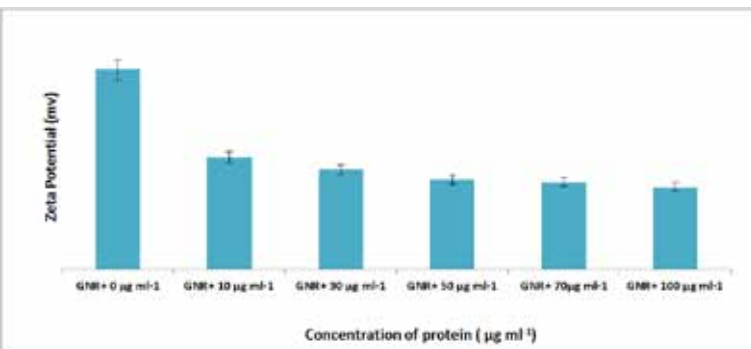
تغییرات شدت فلورسانس آنزیم-نانومیله طلا و نانومیله طلا به تنهایی (به عنوان کنترل) با دستگاه Perkin Elmer LS۵۵ (آمریکا) و در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر انجام گردید.

۳-۴. سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم کندروآتیناز در حضور و عدم حضور نانومیله طلا توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Carry-۱۰۰ بر اساس افزایش جذب در طول موج ۳۳۲ nm و با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی $(\epsilon) 3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد. طبق تعریف، واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که بتواند در طی یک دقیقه، یک میکرومول محصول را در حجم واکنش تولید کند [۱۶ و ۱۷].

۴-۴. مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی (CD) Dichroism

طیف دورنگ‌نمایی دورانی نانومیله‌های طلا در حضور و عدم حضور آنزیم و در بافر فسفات ۵۰ mM با pH ۶/۸ و در محدوده ۲۵۰-۲۰۰ نانومتر ثبت گردید. تجزیه و تحلیل کمی طیف‌ها توسط نرم‌افزار J-715 شرکت جاسکو ژاپن انجام شد.



شکل ۳: پتانسیل زتا و بار نانومیل طلا و میان کنش نانومیل طلا با آنزیم در غلظت های مختلف در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH=۶/۸

محلی با جفت شدگی همراه خواهد بود و میدان های ورودی و خروجی می توانند باعث تشدید این جفت شدگی با پلاسمونیک رزونانس محلی شوند. ویژگی های نوری و الکتریکی نانوذرات طلا توسط شکل، اندازه، ویژگی های سطحی و محیط اطراف آن ها تعیین می شود [۲۰].

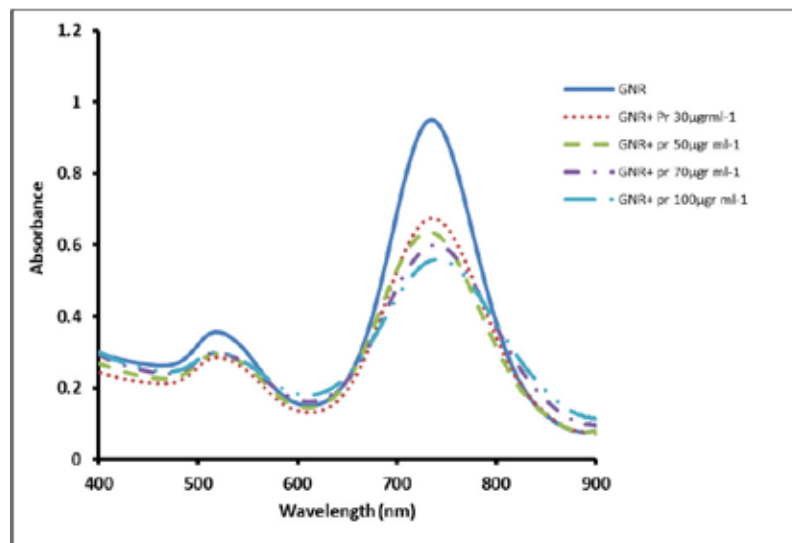
شکل ۴ نانومیل ها را با دو سیگنال فلورسانس نشان می دهد و آنیزوتروپی حاصل از آن ها باعث ایجاد دو سیگنال فلورسانس شده که مربوط به رزونانس پلاسمون طولی و عرضی است. حضور پروتئین سبب تغییر در ضریب شکست و دی الکتریک سطح نانومیل طلا شده که می تواند در شدت فلورسانس تأثیر گذار باشد. همچنین یافته ها حاکی از آن است که با افزایش غلظت پروتئین، ضریب شکست نانومیل افزایش یافته و منجر به تقویت ویژگی های پلاسمونیک و افزایش سیگنال فلورسانس شده است. در نتیجه این ویژگی ها می توانند در کاربرد حسگرهای زیستی نانومیل طلا مفید باشند.

۳. مطالعه فعالیت آنزیم کندروآتیناز

فعالیت آنزیم در حضور و عدم حضور نانومیل طلا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۵ ارائه شده است. با افزایش غلظت نانومیل طلا، فعالیت آنزیم نیز کاسته شده و در این بین دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ نانو مولار نانومیل طلا دارای بیشترین فعالیت در مقایسه با سایرین را دارد. به نظر می رسد که در صورت استفاده این سیستم در In-vivo و کاربرد آن در انتقال دارو، غلظت های ۱۲/۵ و ۲۵ نانومولار را می توان استفاده کرد.

۴. مطالعات دورنگ نمایی دورانی (CD)

طیف پلاسمونیک دورنگ نمایی دورانی در شرایطی ایجاد می شود که موج رزونانس نانوذرات با یکدیگر انباشته شود [۲۱]. بنابراین با یک نانوذره جداگانه که چیدمان منظمی ندارد نمی توان در ناحیه مرئی شاهد طیف پلاسمونیک دورنگ نمایی دورانی بود زیرا هر کدام از نانوذرات اثر یکدیگر را خنثی می کنند و دلیل دیگر برای مشاهده نکردن پلاسمونیک دورنگ نمایی دورانی، دقت کم دستگاه است. با توجه به مشاهده نشدن پلاسمونیک دورنگ نمایی دورانی در مورد نانومیل طلا می توان نتیجه گرفت



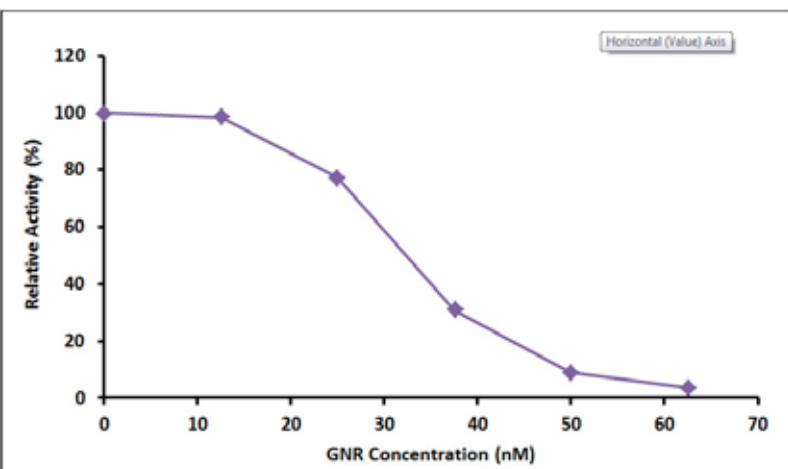
شکل ۲: طیف جذبی نانومیل طلا در حضور و عدم حضور آنزیم در غلظت های مختلف (۱۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH=۶/۸

حاصل از طیف سنجی قابل توجه بوده به طوری که با افزایش غلظت آنزیم کاهش در مقدار نوسانات پلاسمون سطحی نانومیل طلا مشاهده شد.

۲. مطالعات فلورسانس نانومیل طلا در حضور آنزیم کندروآتیناز

به منظور بررسی ارزیابی نانومیل طلا پس از میان کنش آن ها با پروتئین، طیف پلاسمونیک فلورسانس بررسی شد. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود نانومیل های طلا دارای دو باند نشری فلورسانس هستند که مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی طولی و عرضی نانومیل های طلا می باشند [۱۹]. نسبت اندازه طولی به عرضی نانومیل های طلا در نشر فلورسانس تأثیر گذار است به طوری که هر چه این مقدار افزایش یابد به همان نسبت نشر فلورسانس افزایش می یابد. به نظر می رسد تشدید فلورسانس به دلیل تشدید میدان محلی^۴ است که تابعی از سطح طولی پلاسمون سطحی نانومیل های طلا می باشد به طوری که اگر نسبت سطح طولی به سطح عرضی برابر ۱ باشد در این صورت پیک نشری یک عدد خواهد بود ولی با اضافه شدن این نسبت پیک پلاسمون رزونانس به دو پیک عرضی و طولی شکافته می شود. علاوه بر این پیک طول موج بلندتر، کاهش یافته و جابه جایی قرمز خواهد داشت در حالی که پیک طول موج کوتاهتر کمی جابه جایی آبی خواهد داشت. شدت و موقعیت طول موج نشری بلندتر به خاطر شکل آنیزوتروپی آن بسیار حساس است. به دلیل اندازه ذره و داشتن دو سطح طولی و عرضی تهییج در دو سطح طولی و عرضی رخ می دهد و بنابراین دو پیک نشری متفاوت ایجاد خواهد شد. از طرف دیگر سطوح انرژی شکافته شده نانومیل های طلا باعث فراوانی الکترون های جابه جا شده می شود. بنابراین فوتون های نشری می توانند همزمان فرکانس های متفاوتی را داشته باشند (هر چند که تشدید میدان

۴. Local field

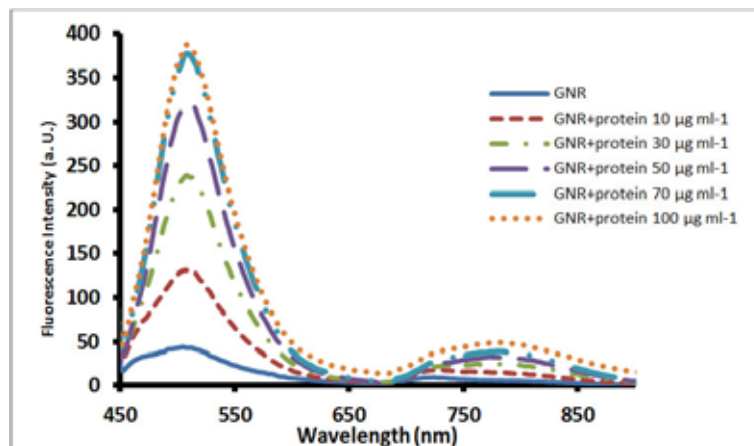


شکل ۵: فعالیت آنزیم کندروآستیناز در حضور غلظت‌های مختلف نانومیل طلا در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۶/۸

دیگر از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات توانایی آن‌ها در بیوسنسورهای نوری است به طوری که نانومیل‌های طلا می‌توانند به پروتئین‌های نشاندار متصل شده و برای شناسایی اهداف بیولوژیکی با تشدید و افزایش حساسیت استفاده گردند. برای بهینه کردن فعالیت آنزیم از غلظت‌های مختلف نانومیل طلا برای میان‌کنش استفاده گردید که از این بین، غلظت ۱۲/۵ نانومولار بیشترین فعالیت را در مقایسه با سایر آنزیم‌های میان‌کنش یافته نشان می‌داد.

کلاس‌های مختلفی از نانوذرات به عنوان حامل‌های دارویی شناخته شده است که شامل لیپوزوم‌ها، میسل‌ها، وزیکل‌ها، دندریمرها و نانوذرات فلزی است. از این میان نانومیل طلا به عنوان سامانه انتقالی برای حمل و رهایش بیومولکول‌ها و داروهای مختلف در سلول‌های مختلف توسعه پیدا کرده است که می‌تواند به دلیل ویژگی‌هایی از قبیل خنثی بودن هسته فلزی طلا و سازگاری زیستی آن اشاره کرد. از ویژگی‌های دیگر می‌توان به اندازه قابل کنترل آن اشاره کرد که سطح مناسبی را برای بارگذاری دارو فراهم می‌کند. نانومیل‌های طلا می‌توانند اثرات نور گرمایی را پشتیبانی کنند. پراکنده شدن انرژی نوری جذب شده به عنوان حرارت می‌تواند برای رهایش فعال داروها به کار گرفته شود. کنترل رهایش دارو از سطح نانوذرات برای نگهداری غلظت دارویی در بحث‌های درمان بسیار ضروری است و باید محل رهایش کنترل شده باشد. محرک‌های مختلفی از قبیل: تغییرات در pH، گلوکاتیون، آنزیم و نور برای رهایش دارو وجود دارد، از آنجایی که نانومیل طلا در طول موج‌های مختلف، جذب مشخص و معینی دارد بنابراین تابش نور در یک طول موج خاص به ترکیب نمونه باعث رهایش داروی متصل شده می‌شود [۲۳].

مطالعه‌ای مبنی بر استفاده از داربست‌های هیدروژلی میکروتوبول‌های لیپیدی برای انتقال و تحویل دارو توسط Lee در سال ۲۰۰۹ انجام گردید، نتایج حاکی از رهایش آرام دارو توسط داربست بود، به عبارت دیگر



شکل ۴: تغییرات شدت فلورسانس حاصل از میان‌کنش نانومیل طلا با غلظت‌های مختلف آنزیم در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۶/۸

که هر کدام از نانومیل‌ها به صورت جداگانه قرار گرفتند و جفت‌شدگی و تقویت موج رزونانسی صورت نگرفته است (داده‌ها نشان داده نشده است).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از نانو تکنولوژی در دهه‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده که از این بین نانومیل‌های طلا با ویژگی‌های منحصر به فرد خود کاربردهای بسیاری را پیدا کرده است. از کاربردهای آن در عرصه پزشکی و درمانی استفاده از آن به عنوان حامل دارویی است. یکی از آنزیم‌هایی که برای درمان ضایعات نخاعی استفاده می‌شود، آنزیم کندروآستیناز است که استفاده از آن برای چندین بار برای بیماران لازم و ضروری است. لذا استفاده از نانوذرات به عنوان بستری برای انتقال آسان آنزیم، مفید و سودمند می‌باشد. در این مقاله مطالعه ساختاری و تغییرات پلاسمونیک رزونانس نانومیل طلا در اثر میان‌کنش با آنزیم توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی، فلورسانس، دورنگ‌نمایی دورانی و همچنین مطالعه فعالیت آنزیم میان‌کنش یافته با نانومیل طلا در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

اتصال نانومیل طلا به آنزیم کندروآستیناز باعث تغییر در شدت جذب باند پلاسمون رزونانسی نانومیل طلا می‌شود. به طوری که سطح با بار مثبت نانومیل طلا با بار منفی سطح پروتئین میان‌کنش داده و باعث کاهش بار مثبت نانومیل طلا خواهد شد [۱۷ و ۱۸]. بنابراین می‌توان از نانومیل طلا به عنوان نانوحامل دارویی، در غلظتی از آنزیم که ساختار نانومیل دستخوش تغییر زیادی نشده باشد استفاده نمود. پلاسمون رزونانس می‌تواند منجر به القای تشدید میدان الکترومغناطیسی شود و ویژگی‌های نوری کروموفورهای اطراف را تحت تأثیر قرار دهد. قابل توجه است که نانوذرات به تنهایی و در عدم حضور آنزیم، فلورسانس ذاتی کمی دارند ولی در اثر میان‌کنش با پروتئین، افزایش فلورسانس مشاهده می‌شود به طوری که با افزایش غلظت آنزیم مقدار نشر فلورسانس نیز افزایش می‌یابد [۲۲]. یکی

References:

1. Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced drug delivery reviews*. 2012; 64(2): 190-9.
 2. Vigdeman L, Khanal BP, Zubarev ER. Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced Materials*. 2012; 24(36): 4811-41.
 3. Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, science and applications*. 2008; 1: 45.
 4. Huang X, Neretina S, El-Sayed MA. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*. 2009; 21(48): 4880-910.
 5. Prabhakar V, Capila I, Carlos J, Pojasek K, Sasisekharan R. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochemical Journal*. 2005; 386(1): 103-12.
 6. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *Journal of Biological Chemistry*. 1968; 243(7): 1523-35.
 7. Nazari-Robati M, Khajeh K, Aminian M, Fathi-Roudsari M, Golestani A. Co-solvent mediated thermal stabilization of chondroitinase ABC I form *Proteus vulgaris*. *International journal of biological macromolecules*. 2012; 50(3): 487-92.
 8. Moghadam TT, Ranjbar B, Khajeh K. Conformation and activity of lysozyme on binding to two types of gold nanorods: A comparative study. *International journal of biological macromolecules*. 2012; 51(1): 91-6.
 9. Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh SP, Gupta V, Chakrabarti P. The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein. *The FEBS journal*. 2010; 277(20): 4184-94.
 10. Chakraborty S, Joshi P, Shanker V, Ansari ZA, Singh SP, Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the داربست استفاده شده باعث بهبود در فعالیت آنزیمی شده و رهایش آن به جای یک ساعت، دو هفته به طول می انجامد و به این صورت باعث ترمیم در جراحات ستون فقرات می شود [۲۴].
- مطالعه رهایش کنترل شده از دوکسوروبیسین که توسط نانومیلۀهای طلا میانجی گری می شود در سال ۲۰۱۳ توسط Pandey انجام گردید. در این روش از سوزن های طلا برای انتقال داروی هوشمند و کارا برای استفاده گسترده از داروهای ضدسرطانی استفاده شد [۲۵]. انتقال و رهایش برنامه ریزی شده مواد دارویی با هدف فیزیولوژیک خاص یک چالش مهم برای درمان های مولکولی به شمار می آید که در این بین نانوذرات طلا با توجه به موارد ذکر شده، می تواند به عنوان هم برای سیستم انتقال مؤثر و کارا و هم برای رهایش مواد دارویی به سلول های مختلف استفاده شود.
- در این مطالعه به بررسی تغییرات ساختاری نانومیلۀ طلا و تغییرات فعالیت آنزیم میان کنش یافته با نانومیلۀ طلا پرداخته شد و نتایج نشان داد که حضور پروتئین نه تنها منجر به ازدست دادن ساختار نانومیلۀ طلا به عنوان حامل دارویی نمی شود بلکه در افزایش سیگنال نیز مؤثر است. از نتایج دیگر بدست آمده در زمینۀ کاربردهای حامل دارویی نانومیلۀ طلا این است که غلظت ۱۲/۵ نانومولار نانومیلۀ طلا بهترین فعالیت را برای آنزیم دارا بود. بنابراین، این مطالعه می تواند چشم اندازی در جهت ترمیم بهتر ضایعات نخاعی با توجه به عملکرد آنزیم و نقش نانوحاملی نانومیلۀ طلا باشد که البته نیاز به تحقیقات بیشتر در سطح حیوانی و انسانی دارد.

structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011; 27(12): 7722-31.

11. Moghadam TT, Ranjbar B, Khajeh K, Etezzad SM, Khalifeh K, Ganjalikhany MR. Interaction of lysozyme with gold nanorods: conformation and activity investigations. *International journal of biological macromolecules*. 2011; 49(4): 629-36.

12. Sau TK, Murphy CJ. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir*. 2004; 20(15): 6414-20.

13. Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater*. 2003; 15(10): 1957-62.

14. Protasevich I, Ranjbar B, Lobachov V, Makarov A, Gilli R, Briand C, Lafitte D, Haiech J. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry*. 1997; 36(8): 2017-24.

15. Ranjbar B, Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review. *Chemical biology & drug design*. 2009; 74(2): 101-20.

16. Nazari-Robati M, Khajeh K, Aminian M, Mollania N, Golestani A. Enhancement of thermal stability of chondroitinase ABC i by site-directed mutagenesis: an insight from Ramachandran plot. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013; 1834(2): 479-86.

17. Gole A, Murphy CJ. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials*. 2004; 16(19): 3633-40.

18. Gole A, Murphy CJ. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials*. 2004; 16(19): 3633-40.

19. John HT. Fluorescence properties of gold nanorods and their application for DNA biosensing. *Chemical communications*. 2005; 31:3924-6.

20. Jian Z, Yong-Chang W, Shi-Nong Y. Fluorescence spectrum characteristics of gold nanorods. *Chinese Physics Letters*. 2004; 21(3): 559.

21. Eustis S, El-Sayed M. Aspect ratio dependence of the enhanced fluorescence intensity of gold nanorods: experimental and simulation study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005; 109(34): 16350-6.

22. Azizi A, Ranjbar B, Moghadam TT, Bagheri Z, Baglou SR. Surface plasmon resonance coupled circular dichroism of DNA-gold nanorods assembly. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014; 47(31): 315401.